



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANANDA BEATRIZ MUNHOZ CRETELLA

ÓLEO DA SEMENTE DA MORINGA OLEIFERA: AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA TÓPICA EM MODELOS DE
INFLAMAÇÃO DE PELE

CURITIBA

2018

ANANDA BEATRIZ MUNHOZ CRETELLA

ÓLEO DA SEMENTE DA MORINGA OLEIFERA: AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA TÓPICA EM MODELOS DE
INFLAMAÇÃO DE PELE

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre em Farmacologia,
no Curso de Pós-Graduação em Farmacologia,
Setor de Ciências Biológicas, da Universidade
Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Michel Fleith Otuki

Co-Orientadora: Prof.^a Dr.^a Daniela de Almeida
Cabrini

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Cretella, Ananda Beatriz Munhoz

Óleo da semente da *Moringa oleifera*: avaliação da atividade anti-inflamatória tópica em modelos de inflamação de pele. / Ananda Beatriz Munhoz Cretella. – Curitiba, 2018.

81 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Michel Fleith Otuki

Co-orientadora: Daniela de Almeida Cabrini

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Pele. 2. Psoríase. 3. Inflamação. 4. Moringa oleifera. I. Título II. Otuki, Michel Fleith. III. Cabrini, Daniela de Almeida. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (20. ed.) 615.1



**ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM FARMACOLOGIA**

No dia trinta de janeiro de dois mil e dezoito às 14:00 horas, no Anfiteatro do Departamento de Farmacologia, ANEXO 1, Setor de Ciências Biológicas, foram instalados os trabalhos de arguição da mestranda **ANANDA BEATRIZ MUNHOZ CRETELLA** para a Defesa Pública de sua dissertação intitulada **ÓLEO DA SEMENTE DA MORINGA OLEIFERA: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA TÓPICA EM MODELOS DE INFLAMAÇÃO DE PELE**. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: MICHEL FLEITH OTUKI (UFPR), FERNANDO BITTENCOURT LUCIANO (PUC/PR), MURYEL DE CARVALHO GONÇALVES (CIENP). Dando início à sessão, a presidência passou a palavra a discente, para que a mesma expusesse seu trabalho aos presentes. Em seguida, a presidência passou a palavra a cada um dos Examinadores, para suas respectivas arguições. A aluna respondeu a cada um dos arguidores. A presidência retomou a palavra para suas considerações finais. A Banca Examinadora, então, reuniu-se e, após a discussão de suas avaliações, decidiu-se pela aprovação da aluna. A mestranda foi convidada a ingressar novamente na sala, bem como os demais assistentes, após o que a presidência fez a leitura do Parecer da Banca Examinadora. A aprovação no rito de defesa deverá ser homologada pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais do programa. A outorga do título de mestre está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, MICHEL FLEITH OTUKI, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos membros da Comissão Examinadora.

Curitiba, 30 de Janeiro de 2018.



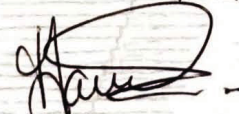
MICHEL FLEITH OTUKI

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)



FERNANDO BITTENCOURT LUCIANO

Avaliador Externo (PUC/PR)



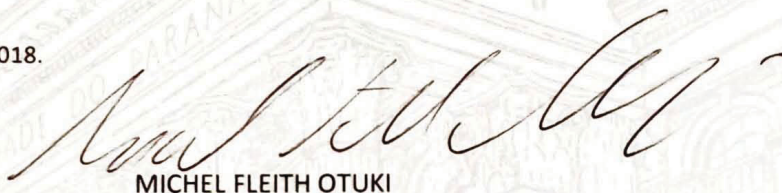
MURYEL DE CARVALHO GONÇALVES

Avaliador Externo (CIENP)

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **ANANDA BEATRIZ MUNHOZ CRETELLA** intitulada: **ÓLEO DA SEMENTE DA MORINGA OLEIFERA: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA TÓPICA EM MODELOS DE INFLAMAÇÃO DE PELE**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa. A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 30 de Janeiro de 2018.



MICHEL FLEITH OTUKI

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)



FERNANDO BITTENCOURT LUCIANO

Avaliador Externo (PUC/PR)



MURIEL DE CARVALHO GONÇALVES

Avaliador Externo (CIENP)

AGRADECIMENTOS

A força divina por apresentar a mim sempre novos desafios e conceder os meios e a força necessária para superá-los.

Aos meus orientadores Michel Fleith Otuki e Daniela de Almeida Cabrini, por me ajudarem a trilhar esse caminho importantíssimo da produção do conhecimento. Muito obrigada pela paciência, dedicação e confiança.

Aos meus colegas de laboratório, por toda ajuda, apoio e cumplicidade nesses últimos anos e em especial a Bruna Soley que sempre se mostrou disposta a instruir, ajudar, revisar, apoiar a cada passo do trabalho.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Farmacologia, pelos ensinamentos valiosos.

Aos servidores do Departamento e a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse projeto.

Aos meus pais Syrlene e Gerson pelo apoio e incentivo na realização deste projeto e em todos os caminhos que decidi percorrer. Por me ensinarem a ter um olhar diferente para o mundo e por me apresentarem o óleo que embasou este trabalho.

Ao meu amado companheiro João Ricardo Martinelli pela compreensão, cumplicidade e auxílio nos momentos em que pareceram pesados para suportar.

Ao meu filho Miguel Munhoz Cretella Martinelli que, apesar de pequeno, fornece a mim um grande motivo e força para o que precisar realizar.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”.

Arthur Schopenhauer

RESUMO

Moringa oleifera (Moringaceae) é uma espécie popularmente utilizada nas regiões sub-Himalaia e na Índia como agente terapêutico e tem seu uso para problemas de pele e lesões em várias culturas. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar o possível potencial do óleo de *Moringa oleifera* no tratamento de condições de pele inflamatórias e hiperproliferativas. Foram utilizados modelos animais de inflamação cutânea aguda e crônica para avaliar a atividade anti-inflamatória da *M. oleifera*. A aplicação tópica de óleo de sementes de *M. oleifera* de diferentes formulações (pura ou em acetona) inibiu parâmetros inflamatórios em modelos inflamatórios agudos e crônicos, reduzindo a formação de edema e influxo celular no tecido inflamado. Demonstramos menos efeitos colaterais em comparação com a dexametasona, embora pareça ter receptores de corticosteróides relacionados às suas ações. Em conjunto, esses resultados sugerem que o óleo de semente de *M. oleifera* pode ser considerado uma nova ferramenta potencial para o tratamento de várias doenças inflamatórias da pele, pois reverteu o processo cutâneo inflamatório e hiperproliferativo de forma muito significativa. Sendo assim, este estudo traz novas evidências sobre a eficácia tópica do óleo de semente de *M. oleifera* para problemas de pele como descrito pelo uso popular e elucidou alguns mecanismos de ação.

Palavras-chave: Doenças inflamatórias. Pele. Psoríase. Dermatite. Inflamação. *Moringa oleifera*. Óleo de sementes.

ABSTRACT

Moringa oleifera (Moringaceae) is a species popularly used in sub-Himalaya regions and India as a healing agent, and have its use to skin problems and lesions in several cultures. Thus, the aim of the present study was to investigate the possible potential of the *Moringa oleifera* seeds oil in the treatment of inflammatory and hyperproliferative skin conditions. Animal models of acute and chronic skin inflammation were used in order to evaluate the *M. oleifera* anti-inflammatory activity. Topical application of *M. oleifera* seeds oil different formulations (pure or in acetone) inhibited inflammatory parameters in acute and chronic skin inflammatory models, reducing edema formation and cellular influx into the inflamed tissue. Showed little side effects in comparison with dexamethasone, although it seems to have the corticosteroids receptors related to its actions. Taken together, these results suggest that the *M. oleifera* seed oil could be considered as a new potential tool for the treatment of several skin inflammatory diseases, since it reversed the skin inflammatory and hyperproliferative process in a very significant manner. Thus, this study brings new evidence about the topical efficacy of *M. oleifera* seed oil for skin problems as described by popular usage and elucidated some action mechanisms.

Keywords: Inflammatory diseases, Skin, Psoriasis, dermatitis, Inflammation, *Moringa oleifera*, seed Oil.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 01 - Representação esquemática das partes da <i>Moringa oleifera</i>	13
FIGURA 02 - Representação da distribuição mundial da <i>Moringa oleifera</i>	14
FIGURA 03 - Sementes de <i>Moringa oleifera</i> descascadas e com casca.....	16
FIGURA 04 - Representação esquemática da anatomia da pele.....	22
FIGURA 05 - Foto com exemplo de criança com lesões por Dermatite Atópica.....	24
FIGURA 06 - Foto com lesão representativa de Psoríase.	25
FIGURA 07 - Caracterização do óleo da semente da <i>Moringa oleifera</i> por GC-MS.....	41
FIGURA 08 - Efeito do óleo da semente da <i>Moringa oleifera</i> (OSMO) no modelo de edema de orelha induzido por fenol	43
FIGURA 09 - Avaliação da atividade anti-edematogênica do óleo da semente da <i>Moringa oleifera</i> (OSMO) em modelo de edema de orelha induzido por ácido araquidônico (AA)	44
FIGURA 10 - Avaliação do efeito do óleo da semente da <i>Moringa oleifera</i> (OSMO) no modelo de edema de orelha induzido por TPA.....	46
FIGURA 11 - Efeito do tratamento tópico com o óleo da semente da <i>Moringa oleifera</i> (OSMO) em modelo de inflamação aguda.....	48
FIGURA 12 - Efeito do óleo da semente da <i>Moringa oleifera</i> (OSMO) no edema induzido pela aplicação múltipla TPA	50
FIGURA 13 - Efeito do tratamento tópico com o óleo da semente da <i>Moringa oleifera</i> (OSMO) na atividade das enzimas MPO e NAG, induzida pela aplicação múltipla de TPA.....	51
FIGURA 14 - Efeito do tratamento tópico com o óleo da semente da <i>Moringa oleifera</i> (OSMO) em modelo de inflamação crônica	53

FIGURA 15- Avaliação do possível efeito sistêmico da administração tópica do óleo da semente da <i>Moringa oleifera</i> (OSMO).	55
FIGURA 16- Avaliação da reversão da atividade anti-inflamatória do óleo da semente da <i>Moringa oleifera</i> (OSMO) pela mifepristona (RU 486).	57
FIGURA 17 - Avaliação do possível efeito tóxico da múltipla aplicação tópica do óleo da semente da <i>Moringa oleifera</i> (OSMO).	59
TABELA 1 - Modelos utilizados para avaliação do efeito do OSMO no edema de orelha.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	- Ácido araquidônico
AINEs	- Anti-inflamatórios não esteroidais
ALFAC	- Solução de álcool, formol e ácido acético
ANOVA	- Análise de variância
AP-1	- Proteína ativadora-1
COX	- Enzima cicloxigenase
EPM	- Erro padrão da média
HaCat	- Linhagem imortalizada de queratinócitos humanos
HTBA	- Hexadeciltrimetilamônio
ICAM	- Molécula de aderência intercelular 1
IgE	- Imunoglobulina E
IFN- γ	- Interferon gamma
IL-3	- Interleucina 3
IL-5	- Interleucina 5
IL-6	- Interleucina 6
IL-13	- Interleucina 13
IL-1 α	- Interleucina 1 alfa
IL-1 β	- Interleucina 1 beta
iNOS	- Enzima óxido nítrico sintase induzível
JAK	- Janus kinase
MAPKs	- Proteínas kinases de ativação mitótica
MPO	- Mieloperoxidase

NAG	- N-acetyl- β -d-glucosaminidase
NF κ -B	- Factor nuclear kappa B
OMS	- Organização Mundial da Saúde
OSMO	- Óleo da semente da Moringa oleífera
PEG400	- Polietilenoglicol 400
PGE2	- Prostaglandina E2
PKA	- Proteína quinase A
PKC	- Proteína quinase C
PLA2	- Fosfolipase A2
RNA	- Ácido ribonucleico
ROS	- Espécies reativas de oxigênio
ROR γ T	- Receptores relacionados ao ácido-retinoico Yt
RU486	- (Mifepristona) Antagonista de receptores corticoides
STAT ativação	- Fatores ativadores de transcrição de sinal e transdutores de
Th1	- Linfócito T do tipo 1 (T helper)
TPA	- Phorbol-12-miristato-13-acetato
TMB	- Tetrametilbenzidina
TNF- α	- Fator de Necrose Tumoral Alfa
VCAM	- Adesão celular vascular-1

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. <i>MORINGA OLEIFERA</i>	13
1.2. PELE E PROCESSOS INFLAMATÓRIOS	18
1.3. FISIOPATOLOGIA DE DOENÇAS CUTÂNEAS	23
2. JUSTIFICATIVA.....	28
3. OBJETIVOS.....	29
3.1. OBJETIVO GERAL.....	29
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1. MATERIAL VEGETAL	31
4.2. ANÁLISE DO ÓLEO DE SEMENTE DE <i>M. OLEIFERA</i>	31
4.3. ANIMAIS	31
4.4. MODELOS DE INFLAMAÇÃO	32
4.5. AVALIAÇÃO DO EDEMA DE ORELHA	34
4.6. EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA APLICAÇÃO TÓPICA DE FENOL.....	35
4.7. EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA APLICAÇÃO TÓPICA DE ÁCIDO ARAQUIDÔNICO.....	35
4.8. EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA APLICAÇÃO TÓPICA DE TPA.....	35
4.9. EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA MÚLTIPLA APLICAÇÃO DE TPA	36
4.10. ENSAIO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA MIELOPEROXIDASE (MPO)	36

4.11. ENSAIO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA N-ACETIL-B-D-GLUCOSAMINIDASE (NAG).....	37
4.12. EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA APLICAÇÃO TÓPICA DE TPA COM TRATAMENTO CONTRALATERAL	38
4.13. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA APLICAÇÃO REPETIDA DE OSMO NA ESPESSURA DA PELE E PESO DE ÓRGÃOS LINFÓIDES	38
4.14. ENSAIO DE REVERSÃO COM ANTAGONISTA DE CORTICOIDE (RU486-MIFEPRISTONA).....	38
4.15. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....	39
4.16. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
5. RESULTADOS.....	40
5.1. CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTOMETRIA DE MASSA	40
5.2. EFEITO DO TRATAMENTO TÓPICO COM OSMO NA DERMATITE IRRITATIVA DE CONTATO.....	42
5.3. EFEITO DO TRATAMENTO TÓPICO COM OSMO EM MODELO DE INFLAMAÇÃO CUTÂNEA CRÔNICA	49
5.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA LOCAL DO OSMO	54
5.5. AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO OSMO APÓS PRÉ-ADMINISTRAÇÃO DE ANTAGONISTA FARMACOLÓGICO DE RECEPTORES CORTICOSTEROIDES – MIFEPRISTONA (RU486)	55
5.6. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO COM OSMO NA ATROFIA CUTÂNEA E NOS ÓRGÃOS LINFÓIDES.	58
6. DISCUSSÃO	60
7. CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS.....	70

1. INTRODUÇÃO

1.1 *MORINGA OLEIFERA*

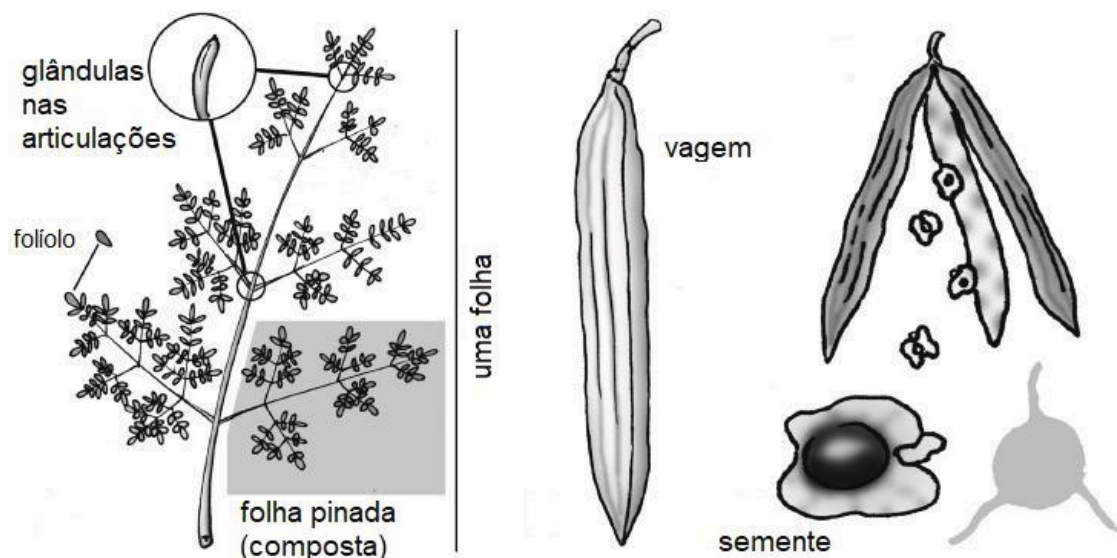


Figura 1: Representação esquemática das partes da *Moringa oleifera*. OLSON, Mark E.; FAHEY, Jed W. *Moringa oleifera*: uma árvore multiuso para áreas tropicais secas. Rev. Mex. Biodiv., México, v. 82, n. 4, p. 1071-1082, dic. 2011. Disponível em http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S187034532011000400001&lng=es&nrm=iso. Acessado em 08/01/2018

Durante séculos, o tratamento com plantas medicinais foi o único recurso disponível para diferentes grupos étnicos no tratamento de enfermidades, e hoje em dia, as plantas ainda são utilizadas na medicina tradicional para tratar, aliviar ou prevenir muitas doenças (EL GHAOUI et al, 2008). É grande o interesse das indústrias no uso de substâncias naturais como fontes de novos medicamentos, principalmente pela necessidade de inovação no tratamento de algumas doenças (CALIXTO, 2000).

De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) cerca de 35 a 80% da população mundial não têm acesso ao atendimento primário de saúde e recorre especialmente às plantas medicinais. A própria OMS

reconhece e estimula o uso de plantas medicinais pela população em países pobres, mas com cuidados especiais quanto ao seu uso (CALIXTO, 2000; STROHL, 2000).

Embora as plantas medicinais sejam utilizadas frequentemente para tratamento e estratégia para o desenvolvimento de novos medicamentos (MANTLE et al, 2001), este recurso é ainda pouco explorado, sendo a avaliação da atividade biológica realizada em apenas uma pequena parcela de espécies de plantas identificadas no mundo (RATES, 2001; VERPOORTE; MEMELINK, 2002).

Uma planta de interesse potencial é a *Moringa oleifera*, uma árvore utilizada como planta medicinal na Índia e regiões do sul do Himalaia, e atualmente amplamente cultivada e bem adaptada a vários países nas regiões tropicais (Figura 2) (FAIZAL et al, 2014).



Figura 2: Representação da distribuição mundial da *Moringa oleifera*. Disponível em <http://www.treesforlife.org/our-work/our-initiatives/moringa/moringa-book>. Acessado em 08/01/2018

A *Moringa oleífera* é considerada uma planta polivalente e com amplo espectro de ação. Na China é utilizada na alimentação, como planta medicinal, como planta ornamental e de sombra, ou ainda, como cerca viva, ou como barreira de proteção eólica (FRIGHETT et al, 2007; FAIZAL et al, 2014). A *Moringa oleífera* também é parte da medicina culinária e de Ayurveda na Índia, com mais de 300 usos descritos (FRIGHETT et al, 2007; FAIZAL et al, 2014). Os usos populares para esta planta na Guatemala incluem o tratamento de infecções dermatológicas, afecções gastrointestinais e doenças reumáticas (FAIZAL et al, 2014). O uso do óleo da semente de *Moringa oleífera* com intuitos cosméticos e para preparação de pele também era conhecido entre os antigos Egípcios (FAIZAL et al, 2014). A partir da década de 90 estudos sobre o potencial de uso das diversas partes desta planta - raiz, semente, folhas, flores – (Figura 1) também chamada de “árvore milagrosa”, “quiabo de quina” e “acácia branca” têm sido conduzidos para avaliar a possibilidade de sua utilização como fonte de proteínas, como suprimento alimentar humano e animal, fonte de óleo vegetal comestível ou fonte de energia combustível, na floculação de impurezas em águas para sua purificação; como matéria prima na fabricação de carvão ativo e como insumo na indústria de celulose. Finalmente, em diversas partes da *Moringa oleífera* têm-se identificado princípios ativos com ação potencial em diferentes áreas da saúde humana (FRIGHETT et al, 2007).

Vários compostos fitoquímicos presentes na *Moringa oleífera* estão distribuídos em diversas proporções em suas folhas, ramos, sementes, vagens e raiz. Os principais fitoquímicos da *M. oleífera* são glucosinolatos, fenólicos, flavonóides, gorduras brutas, ácidos graxos, nutrientes essenciais, minerais e proteínas (ASHIKIN et al. 2016). Esta espécie contém também uma quantidade elevada de glucosinolatos aromáticos tais como glucosinolatos de p-hidroxibenzilo (sinalbina), glucosinolatos de 2-feniletilo (gluconasturtiina), glucosinolatos de benzilo. A glucomoringina, um glucosinolato, é um dos principais compostos encontrados nesta planta, sendo que as folhas e sementes tem a maior concentração deste composto, cerca de 8% de concentração nas sementes (ASHIKIN et al, 2016). O óleo da semente da *Moringa oleífera* (Figura 3) tem cor amarelo claro e sabor leve de noz, sendo

que sua composição de ácidos graxos demonstra uma predominância de ácido oleico, semelhante ao óleo de oliva (75 a 77 %). (NADEEM; IMRAN,2016).

À medida que os compostos químicos extraídos da planta têm sido identificados, possíveis mecanismos de ação têm sido propostos. Estudos recentes *in vitro* mostraram que a glucomoringina é capaz de inibir a via da JAK-STAT, suprimindo a expressão de genes alvo de STAT 5 , induzidos por IL-3 e, em menor grau, genes alvo de STAT 1 e 2, induzidos por interferon, além de atuar como inibidor na via do NFκ-B, sugerindo que estas vias estejam relacionadas à atividade reguladora da planta (MICHKL et al, 2016).



Figura 3: Sementes de *Moringa oleifera* descascadas e com casca. Disponível em <https://colmoringa.com/articulos/para-que-sirven-las-semillas-de-moringa/>. Acessado em 08/01/2018

O extrato da semente de *M. oleifera* apresenta ações anti-fúngicas descritas, o qual apresentou atividade inibitória frente a dermatófitos como, por exemplo, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton*

mentagrophytes e *Microsporum canis*, resultado semelhante foi verificado em avaliação da atividade do extrato das flores desta espécie (ROCHA et al, 2011).

Estudos preliminares investigaram o potencial antiespasmódico, anti-inflamatório e diurético de diversas partes da planta *M. oleifera*. A ação antiespasmódica foi observada em um segmento de duodeno retirado de ratos Wistar com contrações induzidas por acetilcolina, e a inibição de tais contrações foi aferida após exposição à infusão de diversas partes da planta, em diferentes concentrações, sendo que os resultados foram comparados à atropina (com conhecida ação antiespasmódica) (CÁRCERES et al. 1992). Os resultados mostraram ação antiespasmódica apenas para infusão da semente de maneira dose-dependente, sem ação demonstrada para outras partes da planta (folhas, raiz, vagens e flores). Por meio de regressão, o ED₅₀ (dose necessária para inibir em 50 % as contrações), para bloquear as contrações, foi calculado em 984 mg (limites de confiança de 95% = 549-1767 mg). Quanto à ação anti-inflamatória a mesma foi demonstrada pelo modelo de edema de pata induzido por carragenina, sendo que o tratamento com infusão das sementes de *M. oleifera* administrado por via oral demonstrou inibição da formação do edema de maneira dose-dependente em mensurações realizadas após 3 e 5 horas da aplicação de carragenina nas patas traseiras, havendo maior inibição na dose de 1000 mg/Kg. A ação diurética também foi demonstrada após administração de infusão de sementes por via oral 1000 mg/Kg.(CÁRCERES et al. 1992)

Um estudo recentemente publicado sobre o potencial benefício anti-inflamatório tópico do extrato etanólico de folhas de *Moringa* demonstrou a redução na expressão de TNF- α , CCL17, IL-1 β , RNA mensageiro de citocinas relacionadas a IL-6 pró-inflamatória, e proteínas kinases de ativação mitótica (MAPKs) em células de queratinócitos – HaCat induzidos por TNF- α /IFN- γ . Neste mesmo estudo foi demonstrado que a espessura da epiderme e derme da orelha, infiltração de mastócitos, nível de imunoglobulina sérico, assim como a expressão de várias citocinas no tecido da orelha, linfonodos e baço foi melhorado com o tratamento com o extrato etanólico das folhas da *M. oleifera* em modelo de indução de dermatite atópica com exposição repetida a extrato

de *Dermatophagoides farinae* (CHOI et al, 2016). Além disso, foi observada no tecido da orelha dos camundongos tratados, uma redução da expressão de receptores relacionados ao ácido-retinoico γ T (RORYT), linfopoietina tímica estromal e RNA mensageiros de receptores de manose (CD206) além de melhora do tamanho dos linfonodos cervicais. Estes resultados sugeriram fortemente uma atividade anti-inflamatória dos compostos desta planta em modelo de dermatite atópica (CHOI et al, 2016).

Um estudo sobre o potencial estímulo do processo de cicatrização pelo extrato de folhas de *M. oleifera in vitro* foi justificado pela presença de compostos como o 4 - [(4'-O-acetil- α -L-ramnosiloxi) benzil] isotiocianato, 4 - [(3'-O-acetil- α -L-ramnosiloxi) benzil] isotiocianato e S-metil-N- {4 - [(α -L-ramnosiloxi) benzil]} tiocarbamato, que são glicosídeos fenólicos com potencial anti-inflamatório (GOTHAI et al, 2016). Os resultados mostram que o extrato da folha da planta na concentração de 12,5 e 25 μ g / mL aumentaram a proliferação celular e migração de fibroblastos em modelos de proliferação celular e *scratch* (GOTHAI et al, 2016).

Estes estudos demonstram potenciais utilizações farmacológicas das diversas partes da *Moringa oleifera*, contudo ainda há muito que ser estudado para a elucidação de sua atividade e mecanismos de ação.

1.2 PELE E PROCESSOS INFLAMATÓRIOS

A pele é um dos maiores órgãos do corpo humano representando 15% do peso corporal. Ela compõe-se, essencialmente, de três grandes camadas: a camada superior (epiderme); a camada intermediária (derme ou cório); e a camada profunda, (hipoderme ou tecido celular subcutâneo) (SAMPAIO et al, 2000). A pele é constantemente sujeita a lesões e exposição a agentes patogênicos, constitui a primeira barreira de proteção contra agentes externos potencialmente danosos ao organismo. Neste processo ocorre a geração de uma resposta inflamatória que é constituída da ativação e interação de diversos componentes celulares, tanto residentes (terminações nervosas, queratinócitos,

fibroblastos, mastócitos, células endoteliais e macrófagos) quanto células que migram para o local após iniciado o processo inflamatório (neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos) (BUCKLE e HEDGECK, 1997; PUIGNERO e QUERALT, 1997; BHAGWAT et al, 1999).

Durante o processo inflamatório diversos mediadores pró-inflamatórios solúveis são liberados como neuropeptídeos (substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, etc.), metabólitos do ácido araquidônico (leucotrienos, prostaglandinas, etc.), monoaminas (histamina, serotonina, etc.) e citocinas (interleucinas, interferons, etc.). Após a ligação em seus receptores ocorre produção de novas substâncias denominadas segundos mensageiros que ativam proteínas quinases como a PKC, PKA e as proteínas MAPK, por sua vez, essas proteínas podem ser as responsáveis pela ativação de fatores nucleares, como o NF- κ B e a proteína ativadora-1 (AP-1), responsáveis pela transcrição de diversas proteínas (citocinas, enzimas, etc.), modulando, mantendo e amplificando a resposta inflamatória (BUCKLE e HEDGECK, 1997; PUIGNERO e QUERALT, 1997; BHAGWAT et al, 1999). A falha destes mecanismos pode gerar uma desregulação da homeostase do órgão, predispondo ao desenvolvimento de processos inflamatórios crônicos (WILLIAMS e KUPPER, 1996; DEBENEDICTIS et al, 2001).

A epiderme é constituída por um epitélio estratificado pavimentoso subdividido em quatro camadas, cada uma com funções distintas (SAMPAIO et al, 2000; CANDI et al, 2005, NORRIS, 2004). A camada ou estrato córneo atua como uma barreira à penetração de organismos externos e toxinas, além de prevenir a perda hídrica. No estrato granuloso, ocorre o início do processo de cornificação dos queratinócitos, onde as células sofrem apoptose e diferenciando-se em corneócitos, No estrato espinhoso, os queratinócitos presentes são os produtores dos filamentos de queratina (queratinização). Finalmente, a camada ou estrato basal é a camada mais profunda e responsável pela proliferação celular, sendo resistente ao processo apoptótico (SAMPAIO et al, 2000; CANDI et al, 2005, NORRIS, 2004).

Aproximadamente 80-85% da epiderme é constituída de queratinócitos, 10-13 % de melanócitos, 4% de células de *Langerhans* e 1% de células de

Merckel (FREINKEL e WOODLEY, 2001; KOSTER e ROOP, 2004). A garantia da manutenção do número de células na epiderme depende do equilíbrio entre proliferação celular e morte celular (diferenciação/apoptose) dos queratinócitos (FUCHS e RAGHAVAN, 2002; CANDI et al, 2005). A epiderme tem a capacidade de auto-renovação, tanto sob condições homeostáticas, quanto em condições nocivas, devido à presença de uma população celular ativa com atividade mitótica presentes na camada basal. Em condições normais, a renovação epidérmica é balanceada pela descamação da camada córnea na superfície à medida que se verifica uma diferenciação celular progressiva, através do processo de queratinização e cornificação, a partir da camada basal em direção à superfície (FUCHS e RAGHAVAN, 2002; CANDI et al, 2005).

A ocorrência de um injúria tecidual leva ao desenvolvimento de um processo inflamatório, onde a proliferação celular na camada basal é alterada, queratinócitos migram até a camada superficial da região lesionada, liberando inúmeras moléculas que facilitam a migração e outras funções celulares, com o intuito de reconstituir a integridade tecidual. Por fim, ocorre a formação do tecido de granulação e reconstituição da matriz dérmica, fibroplasia pelos fibroblastos e angiogênese pelas células endoteliais. Os queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais interagem com células ao redor, mais especificamente, através de integrinas para que ocorra a regeneração da pele (FREINKEL e WOODLEY, 2001).

Encontramos, também na epiderme, os melanócitos, células responsáveis pela produção de pigmentos, e as células de *Langerhans*, células apresentadoras de antígenos (DENNING, 2004). Nas proximidades também são encontrados alguns linfócitos T, células de memória imunológica (SPELLBERG, 2000). A epiderme é avascular, no entanto, mantém relação íntima com a derme pela lâmina basal. Assim sendo, a derme é a responsável pelo suporte sanguíneo da epiderme (SPELLBERG, 2000). Além dessas células na vigência de variados estímulos ocorre a migração de outras células, sendo elas os linfócitos, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos - componentes da imunidade inata ou adquirida (NORRIS, 2004).

A derme é um tecido conectivo cuja espessura é superior ao da epiderme, porém com uma população celular inferior. Esta estrutura é a responsável pela elasticidade, força tênsil e resistência mecânica da pele (HAAKE et al, 2001). Ela é composta por uma camada mais superficial e frouxa - camada papilar; e uma camada mais profunda e mais densa - a reticular (GARTNER e HIATT, 1999). Essas camadas são constituídas por matrizes extracelulares diferentes, sendo que na derme papilar as fibras de colágeno são pouco organizadas e finas, e o colágeno predominante é o do tipo III. Existem ainda fibras elásticas que em conjunto às fibras de colágeno se organizam de forma bastante frouxa (GARTNER e HIATT, 1999; SORRELL e CAPLAN, 2004). Por sua vez, na derme reticular a matriz é mais densa, com fibras mais grossas e melhor organizadas, o colágeno é principalmente o do tipo I, sendo que as fibras elásticas são mais espessas e se agrupam com o colágeno em redes firmemente entrelaçadas (GARTNER e HIATT, 1999; SORRELL e CAPLAN, 2004). Em resumo, a derme é composta por polissacarídeos (hialuronidatos e condroitinsulfatos), substância fundamental (glicoproteínas, proteoglicanas e glicosaminoglicanas), material fibrilar (fibras colágenas, fibras elásticas e fibras reticulares), receptores sensoriais (ex., corpúsculos de Meissner, corpúsculos de Pacini), células dérmicas (fibroblastos), vasos linfáticos e sanguíneos, que permitem a ocorrência da infiltração de células migratórias como, por exemplo, os macrófagos, linfócitos, eosinófilos, neutrófilos, as quais são importantes no processo de resposta de defesa inata ou imune e de regeneração tecidual (RYAN, 2004). Os fibroblastos são células capazes de sintetizar diferentes macromoléculas que entram na constituição da matriz celular como, por exemplo, o colágeno e a elastina (SAMPAIO et al., 2000; HAAKE et al., 2001). Durante um processo inflamatório ou de cicatrização ocorre o aumento da atividade e da proliferação de fibroblastos, devido à ação de alguns mediadores pró-inflamatórios como, por exemplo, a interleucina-1 α (IL-1 α) e interleucina-1 β (IL-1 β) (FREINKEL e WOODLEY, 2001).

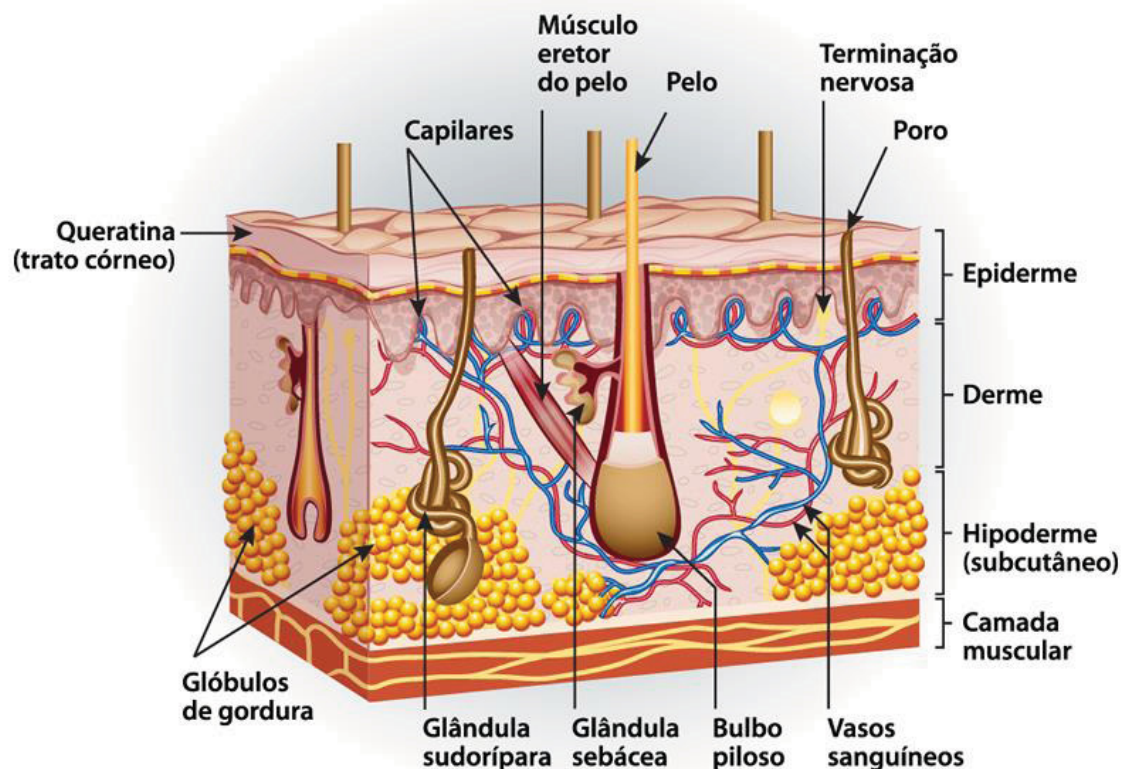


Figura 4: Representação esquemática da anatomia da pele. Disponível em: <http://www.marciodermato.com.br/site/images/desktop/anatomia-da-pele.jpg>. Acessado dia 03/01/2018.

Em resumo, a interação coesa entre essas diversas células das camadas da pele (Figura 4) permite que este órgão responda efetiva e prontamente a uma variedade de estímulos nocivos que ocorrem na interface do organismo com o meio externo, como a ação de toxinas, organismos patogênicos, radiação ultravioleta e extremos de temperatura, garantindo assim a manutenção da homeostasia (WILLIAMS e KUPPER, 1996; HAAKE et al, 2001). Portanto, a pele demonstra ser muito mais do que simplesmente uma barreira física passiva entre o meio externo e interno, mas sim, inquestionavelmente, uma extensão do sistema imunológico (WILLIAMS e KUPPER, 1996; HAAKE et al, 2001).

A camada mais profunda, a hipoderme, possui espessura variável e é composta exclusivamente por tecido adiposo. Esta camada relaciona-se em sua porção superior, com a derme profunda, constituindo assim, a junção dermo-hipodérmica. Funcionalmente, a hipoderme, além de depósito de

reserva nutritiva, participa do isolamento térmico e proteção mecânica do organismo às pressões e traumatismos externos, facilitando a motilidade da pele em relação às estruturas adjacentes (SAMPAIO et al, 2000).

A pele pode sofrer diversos processos anatomopatológicos como degenerações, alterações metabólicas, proliferações, malformações, disfunções e inflamações. Sendo ela intimamente ligada aos demais sistemas orgânicos, é suscetível a alterações decorrentes de anomalias metabólicas e, em contrapartida, grandes alterações cutâneas podem resultar em alterações metabólicas (SAMPAIO et al., 2000).

1.3 FISIOPATOLOGIA DE DOENÇAS CUTÂNEAS

Dermatite é um termo genérico frequentemente utilizado para doenças de pele, principalmente as de origem inflamatória. Manifestações comuns incluem eritema, descamação, vesículas, prurido e liquenificação, quando a inflamação for crônica (FIRESTEIN, 2004; LEUNG et al, 2004). No entanto, existem diversos tipos de dermatite, cada qual, com sua fisiopatologia, sinais e sintomas distintos, algumas delas com desenvolvimento imunomediado e outras por processo irritativo direto. Apesar disso, na prática pode ser difícil a diferenciação entre elas (FIRESTEIN, 2004; LEUNG et al, 2004).

As doenças dermatológicas que tem em sua etiologia componentes inflamatórios e/ou imunológicos, incluindo as dermatites, e a psoríase, caracterizam-se por alterações cutâneas que conferem um aspecto desagradável à pele e que necessitam de tratamento prolongado, além de envolver componentes emocionais, nos quais promovem recidivas ou exacerbação das lesões. Os mecanismos envolvidos na patogênese das doenças inflamatórias cutâneas podem ser distintos, envolvendo processos irritativos ou alérgicos, por exemplo. Sendo assim, as doenças inflamatórias cutâneas não possuem necessariamente as mesmas características e tratamentos, consequentemente (FIRESTEIN, 2004; LEUNG et al., 2004)



Figura 5: Foto com exemplo de criança com lesões por dermatite atópica. Disponível em: <http://schmitzdermatologia.blogspot.com.br/2014/09/doencas-da-primavera-dermatie-atopica.html>. Acessado dia 03/01/2018.

A dermatite atópica (Figura 5) é uma doença inflamatória crônica que se inicia antes dos cinco anos de idade em 80% dos casos (geralmente já na fase de lactação), e que em algumas pessoas pode persistir até a fase adulta (GUTTMAN-YASSKY et al, 2007). Ela pode ser caracterizada como um estado de hiper-reatividade cutânea a estímulos normalmente inócuos a indivíduos não-atópicos. Dentre algumas das características encontradas neste tipo de dermatite estão o ressecamento intenso da pele, prurido, eritema, níveis elevados de IgE e eosinofilia (GUTTMAN-YASSKY et al, 2007; LEUNG et al, 2004). Sua etiologia é bastante complexa, porém vários estudos corroboram o envolvimento da ativação de diferentes vias imunológicas e inflamatórias. Ela é inicialmente caracterizada por níveis elevados de IL-4 e IL-13, em consequência da presença de um infiltrado de células Th2. Essas citocinas induzem a síntese de IgE e IL-5, e esta, por sua vez, tem uma importante função no desenvolvimento e sobrevivência dos eosinófilos. No entanto, durante a fase crônica ocorre uma inversão do perfil de citocinas para o tipo Th1, associada ao aumento da expressão de IFN- γ (GUTTMAN-YASSKY et al, 2007; LEUNG et al, 2004).



Figura 6: Foto com lesão representativa de psoríase. Disponível em: https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcQPg132yr_Ngau0UU7asZFGFtMGg-QZ77q02XT3nIGUfj6G6z6_. Acessado dia 03/01/2018.

Outra doença inflamatória crônica de grande importância é a psoríase (Figura 6), que afeta aproximadamente 2 a 3% da população mundial e apresenta caracteristicamente remissões e exacerbações espontâneas ao longo da vida (NICKOLOFF e NESTLE, 2004). A psoríase pode ter início em qualquer idade, porém estudos epidemiológicos revelam que o aparecimento de lesões iniciais ocorre mais comumente entre os 15 e 25 anos. Atualmente ela é reconhecida como uma doença auto-imune gerada por uma ativação inapropriada do sistema imune celular (KRUEGER e BAWCOCK, 2005). A psoríase é caracterizada por apresentar lesões pápulo-escamosas como consequência da hiperproliferação excessiva dos queratinócitos e da formação de um foco inflamatório. A sua patogenia envolve a integração de leucócitos infiltrados no tecido cutâneo (células T, neutrófilos e mastócitos), células residentes e uma variedade de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, fatores de crescimento e eicosanóides (KRUEGER e BAWCOCK, 2005; NICKOLOFF e NESTLE, 2004).

A dermatite de contato, por sua vez, é uma dermatose inflamatória frequente nos países industrializados, sendo uma das doenças ocupacionais mais comuns (HENNINO et al, 2005). É caracterizada por eritema, pápulas e vesículas, seguidas de ressecamento e descamação. De acordo com os mecanismos fisiopatológicos envolvidos, podem-se distinguir dois tipos de

dermatite de contato: a dermatite de contato irritativa, decorrente dos efeitos tóxicos e pró-inflamatórios de xenobióticos capazes de ativar a imunidade inata da pele; e a dermatite de contato alérgica, também conhecida como hipersensibilidade de contato, que requer a ativação da imunidade adquirida, levando ao desenvolvimento de células T efectoras, que são mediadoras da inflamação cutânea (HENNINO et al, 2005).

São várias as vias envolvidas no processo inflamatório cutâneo, sendo assim existe uma variedade de alvos moleculares que, quando antagonizados ou neutralizados, bloqueiam uma via, conduzindo a um efeito anti-inflamatório e/ou imunossupressor (SIMMONS, 2006). Nesse contexto, a compreensão da ação e do uso de fármacos anti-inflamatórios e imunossupressores nas doenças inflamatórias cutâneas exigem o conhecimento do tipo de reação inflamatória presente (SIMMONS, 2006).

O sistema imune como alvo no tratamento de algumas patologias dermatológicas e a compreensão do mecanismo de ação destes agentes permitiu a transição da terapia clássica com os corticóides tópicos, os quais apresentam grandes alterações fisiológicas, para a terapia com agentes imunomoduladores (NICKOLOFF e NESTLE, 2004). No entanto, os corticóides ainda são os agentes anti-inflamatórios mais empregados no tratamento de doenças inflamatórias cutâneas, devido aos seus efeitos sobre a resposta imune e sua ação anti-inflamatória. Porém, o uso contínuo dos corticóides é frequentemente acompanhado de efeitos adversos severos e muitas vezes irreversíveis, incluindo a atrofia cutânea, telangiectasias, hipertricose, alterações no processo de cicatrização com efeitos colaterais da aplicação tópica e supressão do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, osteoporose, imunossupressão, alteração no crescimento e Síndrome de *Cushing*, entre outros como efeitos da absorção sistêmica mesmo quando ocorre a aplicação tópica (SCHOEPE et al, 2006; SCHÄCKE et al, 2002).

Mesmo com o arsenal de agentes anti-inflamatórios e imunossupressores disponíveis, alguns fatores comprometem a adesão do paciente ao tratamento como o esquema posológico, efeitos adversos indesejáveis, custo elevado do tratamento (LEUNG et al. 2004; GOTTLIEB,

2005). Além disso, alguns medicamentos não atingem a eficácia desejada ou comprometem a resposta imunológica, aumentando o risco a infecções como é o caso de agentes imunossupressores como o metotrexato, os imunobiológicos e inibidores da calcineurina (RANG et al., 2007; FOX et al., 2006; DISEPIO et al., 1999). Assim, a busca por novos agentes têm sido amplamente focada nos produtos naturais, em busca de um fármaco efetivo no tratamento das doenças inflamatórias cutâneas, por estes produtos apresentarem multicomponentes, pouco ou nenhum efeito colateral, além de possuírem o respaldo do uso popular prévio (RANG et al., 2007; FOX et al., 2006; DISEPIO et al., 1999).

2. JUSTIFICATIVA

Embora o uso da planta *Moringa oleifera* seja bastante difundido popularmente e a mesma possua substâncias com grande potencial farmacológico, poucos estudos foram realizados a fim de elucidar o potencial uso do óleo da semente desta espécie, especialmente de seu uso tópico como descrito pelo uso popular, para o tratamento de afecções cutâneas inflamatórias ou propor mecanismos de ação e doses efetivas. Nesse contexto, a hipótese formulada neste trabalho considera que o óleo da semente da *Moringa oleifera* possui efeito anti-inflamatório e anti-proliferativo quando administrado por via tópica em modelos de inflamação cutânea em camundongos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do óleo da semente da *Moringa oleifera* em diversos modelos animais de inflamação cutânea aguda e crônica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o potencial efeito anti-inflamatório do óleo de semente de *Moringa oleifera* (OSMO) em modelo de irritação cutânea induzida por fenol.
- Verificar a atividade do OSMO em impedir a formação de edema em modelo de inflamação de pele induzida por ácido araquidônico.
- Analisar o potencial efeito anti-edematogênica do OSMO modelo de inflamação de pele induzida por TPA (Phorbol-12-miristato-13-acetato).
- Analisar a potencial anti-inflamatório do tratamento tópico com o OSMO em modelo de inflamação crônica de pele por múltiplas exposições ao TPA.
- Analisar a influência do OSMO na migração de células inflamatórias no tecido cutâneo.
- Avaliar possíveis mecanismos de ação do OSMO em modelo de inflamação de pele.

- Analisar potenciais efeitos sistêmicos da aplicação tópica do OSMO em modelo de inflamação de pele induzida por TPA com tratamento contralateral.
- Avaliar potencial toxicidade da administração repetida do OSMO em camundongos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

O óleo de semente de *Moringa oleífera* foi produzido e adquirido em março de 2016 de produtores artesanais (cooperativa BELLANATURA) em Assunção, no Paraguai (Latitude: 25°18'59.2" L e Longitude: 57°33'53.4" O). O mesmo foi produzido com sementes selecionadas, descascadas e prensadas a frio artesanalmente, sem aditivos. Para a obtenção de 70 ml de óleo foram necessárias 400 g de sementes.

4.2 ANÁLISE DO ÓLEO DE SEMENTE DE *M. OLEIFERA*

Os ácidos graxos do óleo de semente de *M. oleífera* foram esterificados com metanol e ácido sulfúrico antes de serem submetidos à cromatografia gasosa / espectrometria de massa (Shimadzu GCMS-QP2010 Plus). A análise foi realizada utilizando uma coluna capilar RTX-5MS (30 m × 0,25 mm i.d., 0,25 µm de espessura do filme). O hélio (99,999%) foi utilizado como gás de arraste com uma taxa de fluxo constante de 1 mL / min e a temperatura do forno de 50 °C (2 min), aumentando a 5 °C / min a 280 °C (12 min). A temperatura do injetor foi de 250 °C. O MS foi conduzido com as seguintes condições de operação: interface 290 °C, fonte de íons 280 °C e energia elétrica 70 eV. Os ácidos graxos foram identificados pela comparação dos espectros de GC-MS com aqueles no banco de dados espectrais de massa NIST 08.

4.3 ANIMAIS

Os experimentos foram realizados com camundongos Swiss fêmeas (25-30 g) alocados aleatoriamente em diferentes grupos. Os alimentos e a

água foram fornecidos *ad libitum* e os animais foram mantidos em um ciclo de luz / escuridão de 12 h e temperatura ambiente controlada (22 ± 2 ° C). Os animais foram mantidos em adaptação ao laboratório durante pelo menos 1 h antes dos testes e foram utilizados apenas uma vez. Os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pelo Comitê de Ética para o uso de animais (CEUA) da Universidade Federal do Paraná com número 1074.

4.4 MODELOS DE INFLAMAÇÃO

Os animais utilizados nos modelos de edema de orelha induzidos por TPA, ácido araquidônico (AA) e fenol, aplicação múltipla de TPA e modelo de tratamento contralateral foram divididos aleatoriamente em grupos distintos e receberam o tratamento de acordo com a tabela 1.

Modelos		Grupos
TPA - 2,0 µg/orelha	Agudo	Controle; Dexametasona (0,1mg/orelha); OSMO (1; 3;10 e 20 µl/orelha)
Ácido Araquidônico (AA) - 2,0mg/orelha	Agudo	Controle; Indometacina (2,0mg/orelha); OSMO (10 e 20 µl/orelha)
Fenol 10 %	Agudo	Controle; Dexametasona (0,1mg/orelha); OSMO (10 e 20 µl/orelha)
Múltipla aplicação de TPA - 2,0 µg/orelha	Crônico	Controle; Dexametasona (0,1mg/orelha); OSMO (10 e 20 µl/orelha)
Contralateral - 2,0 µg/orelha	Agudo	Controle; Dexametasona (0,1mg/orelha); OSMO (20 µl/orelha)

Tabela 1: Modelos utilizados para avaliação do efeito do OSMO no edema de orelha

- Grupo controle: Apenas o agente indutor de inflamação;
- Grupo controle positivo: Indometacina ou Dexametasona;
- Grupos tratados com o óleo de semente de *Moringa oleifera*: 20 µl/orelha (puro), 1; 3; 10 µl/orelha (diluído em acetona);

4.5 AVALIAÇÃO DO EDEMA DE ORELHA

O modelo animal *in vivo* mais utilizado para estudar o processo inflamatório cutâneo é a indução de edema na orelha de camundongos (GABOR, 2000). Este modelo consiste num método rápido e simples, requer pouca quantidade de substâncias e permite resultados reprodutíveis. No que diz respeito à sua aplicação farmacológica, este modelo induzido por diferentes agentes (ex.: TPA, fenol, ácido araquidônico) permitem uma variedade de modelos de inflamação cutânea apropriados para a avaliação tanto tópica quanto sistêmica de agentes sintéticos, extratos de plantas, bem como substâncias isoladas de plantas (GABOR, 2000; WINYARD e WILLOUGHBY, 2003).

Este modelo foi empregado com o objetivo de verificar inicialmente a formação de edema e posteriormente a análise de outros parâmetros do processo inflamatório com coleta de amostras (círculos de 6 mm de diâmetro da orelha de camundongo) após a eutanásia dos animais. O edema de orelha foi expresso como o aumento da espessura da orelha dos camundongos em µm.

A espessura foi medida antes e após a indução do processo inflamatório utilizando um micrômetro digital (Great MT-04513). A medida foi realizada próxima à extremidade medial da orelha e registrada sua espessura através da diferença entre a primeira medida (basal) e a medida feita após a aplicação do agente flogístico. Para minimizar variações de medida na técnica, os experimentos foram realizados por um único experimentador.

4.6 EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA APLICAÇÃO TÓPICA DE FENOL

A dermatite induzida por fenol é um dos modelos animais de dermatite de contato utilizado para produzir irritação imediata. É um modelo de inflamação cutânea que mimetiza a dermatite de contato que ocorre em humanos (LIM et al., 2004). Para verificar a atividade do OSMO nesse modelo foram utilizados grupos com número de 4 a 5 animais. O edema foi induzido pela aplicação tópica de fenol 10% em acetona (20 µL/orelha) na orelha direita de camundongos. O OSMO puro (20 µl /orelha) e diluído em acetona (10 µl /orelha), assim como a dexametasona (0,1 mg/orelha), usada como controle positivo, foram aplicados imediatamente após o fenol nos grupos experimentais. A espessura da orelha foi medida antes (basal) e 2 h após a aplicação do agente flogístico (GABOR, 2000).

4.7 EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA APLICAÇÃO TÓPICA DE ÁCIDO ARAQUIDÔNICO

Ao ser metabolizado o ácido araquidônico dá origem a vários mediadores como prostaglandinas e leucotrienos, que promovem a formação do edema, (HUMES et al, 1986). Nesse modelo é possível identificar compostos que inibem esse metabolismo. Para verificar a atividade do OSMO nesse modelo foram utilizados grupos com número de 4 a 5 animais. O ácido araquidônico (2 mg/orelha) foi administrado topicamente na orelha direita dos camundongos. Em seguida, o OSMO puro (20 µl /orelha) e diluído em acetona (10 µl /orelha), assim como o controle positivo indometacina (2 mg/orelha) diluída em acetona até o volume de 20 µl, foram aplicados topicamente. O edema foi avaliado 1 h após o desafio com o agente flogístico (YOUNG et al, 1984; CRUMMEY et al, 1987).

4.8 EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA APLICAÇÃO TÓPICA DE TPA

Um dos constituintes ativos do óleo de cróton é o 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA). A aplicação tópica de ésteres de forbol, como o TPA, induz inflamação na pele e respostas hiperproliferativas (quando aplicado de forma crônica) nos animais, assemelhando-se sob muitos aspectos aos sinais de algumas doenças de pele como a psoríase (GABOR, 2000).

Sendo assim, o processo do edema foi induzido pela aplicação tópica de TPA (2,0 µg/orelha) na orelha direita de camundongos (número de 4 a 5 animais por grupo) sobre um volume de 20 µl. O OSMO puro (20 µl /orelha) ou diluído em acetona (1, 3, 10 µl /orelha) e a dexametasona (controle positivo) foram aplicados logo após a aplicação do TPA. A variação da espessura da orelha foi avaliada 6 horas após a aplicação do agente flogístico (DE YOUNG et al,1989). Após 24 horas da administração de TPA foram coletadas amostras das orelhas dos camundongos (6mm) para posteriores análises.

4.9 EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA MÚLTIPLA APLICAÇÃO DE TPA

Esse é um modelo de inflamação crônica que permite avaliar a ação anti-inflamatória do OSMO frente a um processo inflamatório já estabelecido. O processo inflamatório crônico foi induzido pela aplicação de TPA (2,0 µg/orelha) em dias alternados durante 9 dias na orelha direita dos camundongos divididos em grupos de 5 a 6 animais. Os tratamentos com o óleo puro (20 µl /orelha) ou diluído em acetona (10 µl /orelha) e a dexametasona (0,1mg/orelha) começaram a ser administrados a partir do quinto dia de experimento, sendo aplicados por via tópica durante 4 dias consecutivos (2 vezes ao dia) e o edema avaliado diariamente (STANLEY et al, 1991). No 9º dia do protocolo experimental, os animais foram sacrificados e amostras de 6 mm de diâmetro de tecido das orelhas coletados e armazenados a -70 °C para serem submetidas a avaliações subsequentes.

4.10 ENSAIO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA MIELOPEROXIDASE (MPO)

A atividade da enzima MPO é utilizada como indicativo da presença de leucócitos polimorfonucleares no tecido inflamado. Para a avaliação da atividade da enzima MPO foi utilizada a metodologia de Bradley e colaboradores (1982) modificada por De Young e colaboradores (1989). As amostras de tecido (6 mm) da orelha dos camundongos submetidos ao modelo de edema de orelha induzido por aplicação aguda e múltipla de TPA, foram adicionadas a 0,75 ml de tampão fosfato de sódio 80 mM (pH 5,4), contendo 0,5% de hexadeciltrimetilamônio (HTBA) e homogeneizadas por 45 s a 0°C. O homogenato foi decantado em microtubos e adicionado a 0,75 ml de tampão

fosfato (anteriormente descrito). As amostras (1,5 ml) foram centrifugadas a 11.200 x g a 4 °C por 20 min. Triplicatas de 30 µl do sobrenadante foram colocadas em placas de 96 poços, adicionando 200 µl de uma mistura contendo 100 µl de tampão fosfato de sódio 80 mM (pH 5,4), 85 µl de PBS 0,22 M (pH 5,4) e 15 µl de peróxido de hidrogênio 0,017% em cada poço. A adição de 20 µl de tetrametilbenzidina.HCl (TMB) 18,4 mM dissolvida em uma solução aquosa de dimetilformamida a 8%, promove o início da reação. Posteriormente a placa foi incubada a 37°C por 3 min, adicionando 30 µl de acetato de sódio 1,46 M (pH 3,0) em cada poço para interromper a reação. A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente usando leitor de placas (Bio-Tek Multi-Mode Microplate reader, Synergy HT) cuja leitura da absorbância foi realizada a 620 nm.

4.11 ENSAIO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA N-ACETIL-B-D-GLUCOSAMINIDASE (NAG)

A atividade da enzima NAG é utilizada como indicativo da presença de leucócitos mononucleares no tecido inflamado. A atividade da NAG foi avaliada utilizando a metodologia de Sanchez e Moreno (1999). As amostras de tecido (6 mm) da orelha dos camundongos submetidos ao modelo de edema induzido por aplicação aguda e múltipla de TPA foram submetidas a protocolo semelhante ao descrito no item 4.10, contudo triplicatas de 25 µl do sobrenadante foram colocadas em placas de 96 poços, adicionando 100 µl de tampão citrato 50 mM (pH 4,5), e a reação foi iniciada pela adição de 25 µl de p-nitrofenil-acetamida-µ-D-glicopiranosídeo (2,24 mM) dissolvido em água ultrafiltrada. Em seguida a placa foi incubada a 37°C por 1 h e a reação interrompida pela adição de 30 µl de tampão glicina 200 mM (pH 10,4) em cada poço. A atividade enzimática da NAG foi determinada colorimetricamente usando leitor de placas (Bio-Tek Multi-Mode), cuja leitura da absorbância foi realizada a 450 nm.

4.12 EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA APLICAÇÃO TÓPICA DE TPA COM TRATAMENTO CONTRALATERAL

O edema de orelha foi induzido na orelha direita dos camundongos divididos em grupos de 5 animais cada, pela aplicação tópica de TPA (2,0 µg/orelha), sobre um volume de 20 µl. O OSMO puro (20 µl /orelha) ou diluído em acetona (10 µl /orelha) e a dexametasona (0,1mg/orelha) foram aplicados topicamente na orelha contralateral (esquerda), seguindo o mesmo procedimento, logo após a aplicação do TPA na orelha direita. A variação da espessura da orelha foi avaliada 6 horas após a aplicação do agente flogístico (YOUNG et al, 1984).

4. 13 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA APLICAÇÃO REPETIDA DE OSMO NA ESPESSURA DA PELE E PESO DE ÓRGÃOS LINFÓIDES

Com o intuito de avaliar a possível toxicidade da aplicação múltipla do OSMO, os animais foram tratados com OSMO ou dexametasona por 7 dias a cada 12 horas (duas vezes por dia) . Os animais foram divididos em grupos de 6 a 7 animais e separados em 3 grupos: OSMO (20 µl / orelha), dexametasona (0,1 mg / orelha) e Naive (controle). A espessura da orelha foi medida antes do início do tratamento (basal) e no último dia de tratamento. No oitavo dia, os animais foram eutanasiados e o peso do baço, glândulas adrenais, linfonodo auricular e timo foram aferidos, assim como espessura da pele.

4.14 ENSAIO DE REVERSÃO COM ANTAGONISTA DE CORTICÓIDE (RU486-MIFEPRISTONA)

Com o intuito de verificar o possível envolvimento de receptores de corticosteroides na atividade anti-inflamatória tópica de OSMO, os animais divididos em grupos de 5 camundongos cada, foram pré-tratados com o antagonista farmacológico RU486 (mifepristona) (50 mg / kg, sc) ou com o seu veículo Polietilenoglicol 400 (PEG400) e, após 30 minutos, o edema de orelha foi induzido por aplicação de TPA e os tratamentos tópicos realizados com OSMO (20 µg / orelha) ou dexametasona (0,1 mg / orelha). A espessura da orelha foi avaliada 6h após a aplicação do agente flogístico, e utilizada como indicador do processo inflamatório (PINTO et al, 2010).

4.15 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

As amostras de tecido (6mm) coletadas dos camundongos submetidos ao modelo de edema de orelha induzido por TPA agudo e crônico foram fixadas em solução ALFAC (85 mL de álcool 80%, 10 mL de formol 40% e 5 mL de ácido acético glacial) num período de 16 h, sendo em seguida conservadas em álcool 70%, até início do processo de desidratação. As orelhas foram posteriormente desidratadas, emblocadas em parafina, seccionadas em cortes de 5 μ m em micrótomo e coradas com hematoxilina e eosina (H.E). A infiltração de leucócitos foi avaliada em áreas representativas com aumento de 400x. A quantificação dos leucócitos presentes na derme foi realizada através da contagem total de núcleos corados, com o auxílio do *software Image J*.

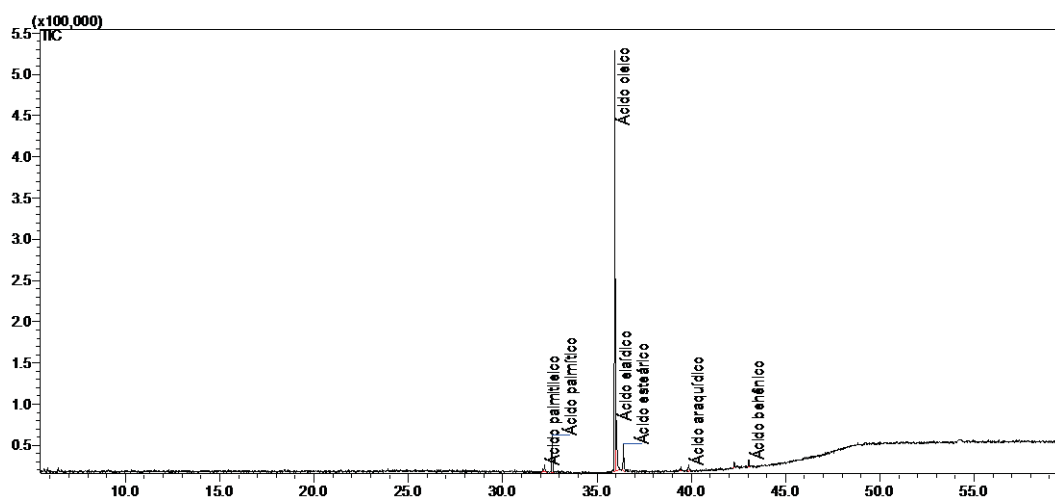
4.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Os dados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) de uma via ou de duas vias (modelo crônico), seguida do teste de múltipla comparação de *Newman-Keuls*. Valores de P menores do que 0,05 ($P < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância. Os cálculos foram realizados utilizando o *Software* estatístico *GraphPad Prism version 6.00*, San Diego Califórnia, EUA.

5. RESULTADOS

5.1 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTOMETRIA DE MASSA

O perfil cromatográfico do óleo de semente de *M. oleifera* mostrou um pico importante e uma percentagem relativa mais elevada em relação ao composto de ácido oleico, com aproximadamente 72,27% (Figura 7).



Tempo de retenção (min)	% relativa	Composto sugerido
32.132	0.46	Não identificado
32.218	1.08	Ácido palmítico
32.625	6.36	Ácido palmítico
35.948	72.27	Ácido oleico
36.046	10.64	Ácido eláidico
36.399	5.09	Ácido esteárico
39.446	0.49	Não identificado
39.858	1.25	Ácido araquídico
42.277	1.00	Não identificado
43.055	1.36	Ácido behênico

Figura 7. Caracterização do óleo da semente da *Moringa oleífera* por GC-MS. O óleo da semente da *Moringa oleífera* (OSMO) foi submetido à cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massas (Shimadzu -GCMS-QP2010 Plus).

5.2 EFEITO DO TRATAMENTO TÓPICO COM OSMO NA DERMATITE IRRITATIVA DE CONTATO

O edema de orelha induzido por fenol é um dos modelos de dermatite de contato em animais utilizados para produzir irritação imediata. Este é um modelo de inflamação cutânea que imita a dermatite de contato que ocorre em humanos (LIM et al., 2004). Os resultados mostraram que a administração tópica de OSMO foi capaz de reduzir a formação de edema induzido por fenol nos grupos tratados com as diferentes concentrações (Figura 8). O tratamento tópico com diferentes concentrações de OSMO inibiu a formação de edema induzido por fenol (10%) em $61,2 \pm 10\%$ (10 μ l / orelha), $59,2 \pm 12,6\%$ (20 μ l / orelha), quando comparado ao grupo controle. O grupo de controle positivo, dexametasona, apresentou redução de $70,1 \pm 6,1\%$ (Figura 8).

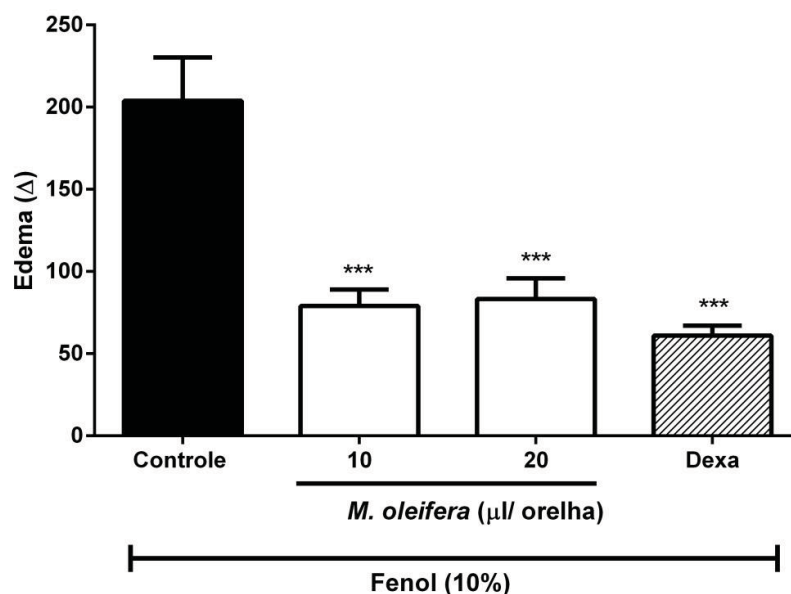


Figura 8. Efeito do óleo da semente da *Moringa oleifera* (OSMO) no modelo de edema de orelha induzido por fenol. O processo inflamatório foi induzido na orelha dos animais pela administração tópica de fenol 10%. Em sequência, foi realizado o tratamento tópico com o OSMO puro (20 μ l / orelha), diluído em acetona (10 μ l / orelha) ou dexametasona (0,1 mg/orelha). Após 2 horas da aplicação do agente flogístico, a espessura das orelhas foi medida com o auxílio de um micrômetro. As barras representam a média \pm EPM (n= 4-5) do aumento da espessura da orelha. Os símbolos representam o índice de significância quando comparados os grupos tratamento com o grupo controle (C). ***P<0,001.

Da mesma forma, os resultados mostraram que a administração tópica de AA provocou aumento da espessura da orelha quando avaliada 1 h após a aplicação (Figura 9). O tratamento tópico com OSMO puro foi capaz de reduzir o edema induzido por AA (2 mg / orelha), sendo igual a $34,5 \pm 7,6\%$ (20 μ l / orelha). A indometacina (2 mg / orelha), grupo controle positivo, inibiu a formação de edema em $68,9 \pm 7,3\%$, quando comparado ao grupo controle. Contudo, a aplicação de OSMO na concentração de 10 μ l / orelha não interferiu no edema induzido por AA (Figura 9).

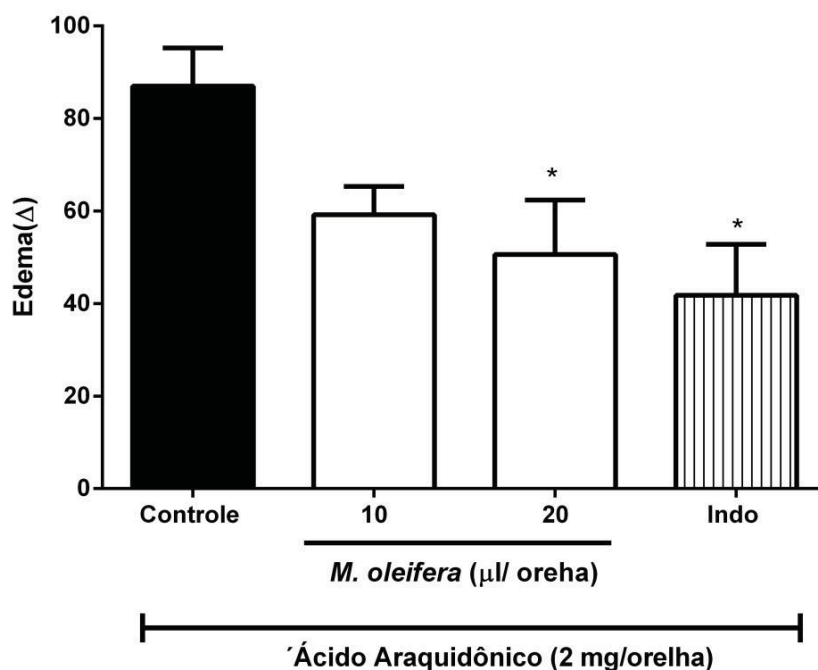


Figura 9. Avaliação da atividade anti-edematogênica do óleo da semente da *Moringa oleifera* (OSMO) em modelo de edema de orelha induzido por ácido araquidônico (AA). O processo inflamatório foi induzido na orelha dos animais pela administração tópica de AA (2,0 mg/orelha). Em sequência, foi realizado o tratamento tópico com o OSMO puro (20 μl / orelha), diluído em acetona (10 μl / orelha) ou indometacina (2,0 mg/orelha). Após 1 hora da aplicação do agente flogístico, a espessura das orelhas foi medida com o auxílio de um micrômetro. As barras representam a média ± EPM (n= 4-5) do aumento da espessura da orelha. Os símbolos representam o índice de significância quando comparados os grupos tratamento com o grupo controle (C). *P<0,5.

A aplicação tópica de TPA (2,0 μg) nas orelhas dos camundongos promoveu um aumento significativo na espessura da orelha 6 h após a administração. Diferentes concentrações de aplicação tópica de OSMO foram capazes de reduzir a formação de edema induzido por TPA (Figura 10A). As inibições mais altas foram observadas em doses de 3, 10 e 20 μl / orelha de OSMO, que foram $62,5 \pm 18,0\%$, $69,0 \pm 11,1\%$ e $69,2 \pm 11,4\%$, respectivamente. Sendo que o OSMO na concentração de 1 μl / orelha inibiu $25,3 \pm 13,5\%$, quando comparado com o grupo controle. A droga de referência dexametasona (0,1 mg / orelha) também causou uma inibição significativa do edema da orelha ($87,61 \pm 7\%$) (Figura 10A).

Conforme ilustrado na Figura 10B, a aplicação tópica de TPA promoveu aumento na atividade enzimática da MPO, enquanto o tratamento tópico com as diferentes concentrações de OSMO reduziu o aumento na atividade da MPO (indicativo indireto de redução de polimorfonucleares). Estas inibições foram iguais a $47,52 \pm 0,8\%$ (3 μl / orelha), $75,5 \pm 0,4\%$ (10 μl / orelha) e $95,6 \pm 0,3\%$ (20 μl / orelha). Não foi possível observar diferença estatística no efeito do OSMO na dose de 1 μl / orelha, quando comparado ao controle. O controle positivo, dexametasona, foi capaz de reverter o aumento da atividade enzimática MPO em $95,74 \pm 0,05\%$ (Figura 10B).

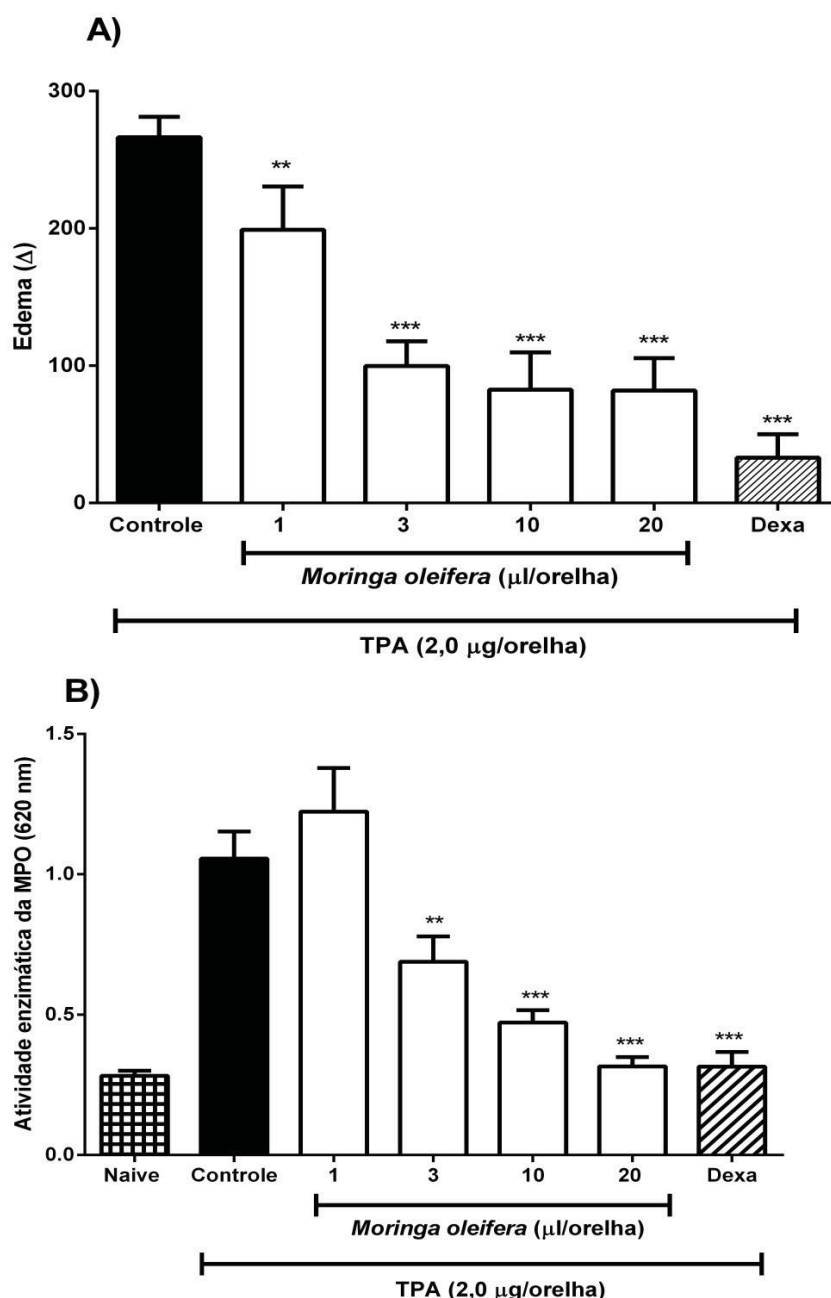


Figura 10. Avaliação do efeito do óleo da semente da *Moringa oleifera* (OSMO) no modelo de edema de orelha induzido por TPA. O processo inflamatório foi induzido na orelha dos animais pela administração tópica de TPA (2,0 μg/orelha). Em seguida, foi realizado o tratamento tópico com o OSMO puro (20 μl / orelha), diluído em acetona (1, 3 ou 10 μl / orelha) ou dexametasona (0,1 mg/orelha). (A) Após 6 horas da aplicação do agente flogístico, a espessura das orelhas foi medida com o auxílio de um micrômetro. (B) Após 24 horas, amostras teciduais (6mm) foram coletadas e submetidas à análise da atividade da enzima MPO. As barras representam a média ± EPM (n= 4-5) do aumento da espessura da orelha. Os símbolos representam o índice de significância quando comparados os grupos tratamento com o grupo controle (C). **P<0,01 e ***P<0,001.

Somado a isso, através da análise histológica, observou-se que o tratamento com OSMO reduziu o número de células migratórias em $25,63 \pm 12,1\%$ (1 μ l / orelha), $42,81 \pm 4,2\%$ (3 μ l / orelha), $54,08 \pm 2,6\%$ (10 μ l / orelha) e $67,60 \pm 6,46\%$ (20 μ l / orelha), enquanto a dexametasona reduziu em $83,94 \pm 3,4\%$ (controle $88,75 \pm 5,72$ células / campo) (Figura 11).

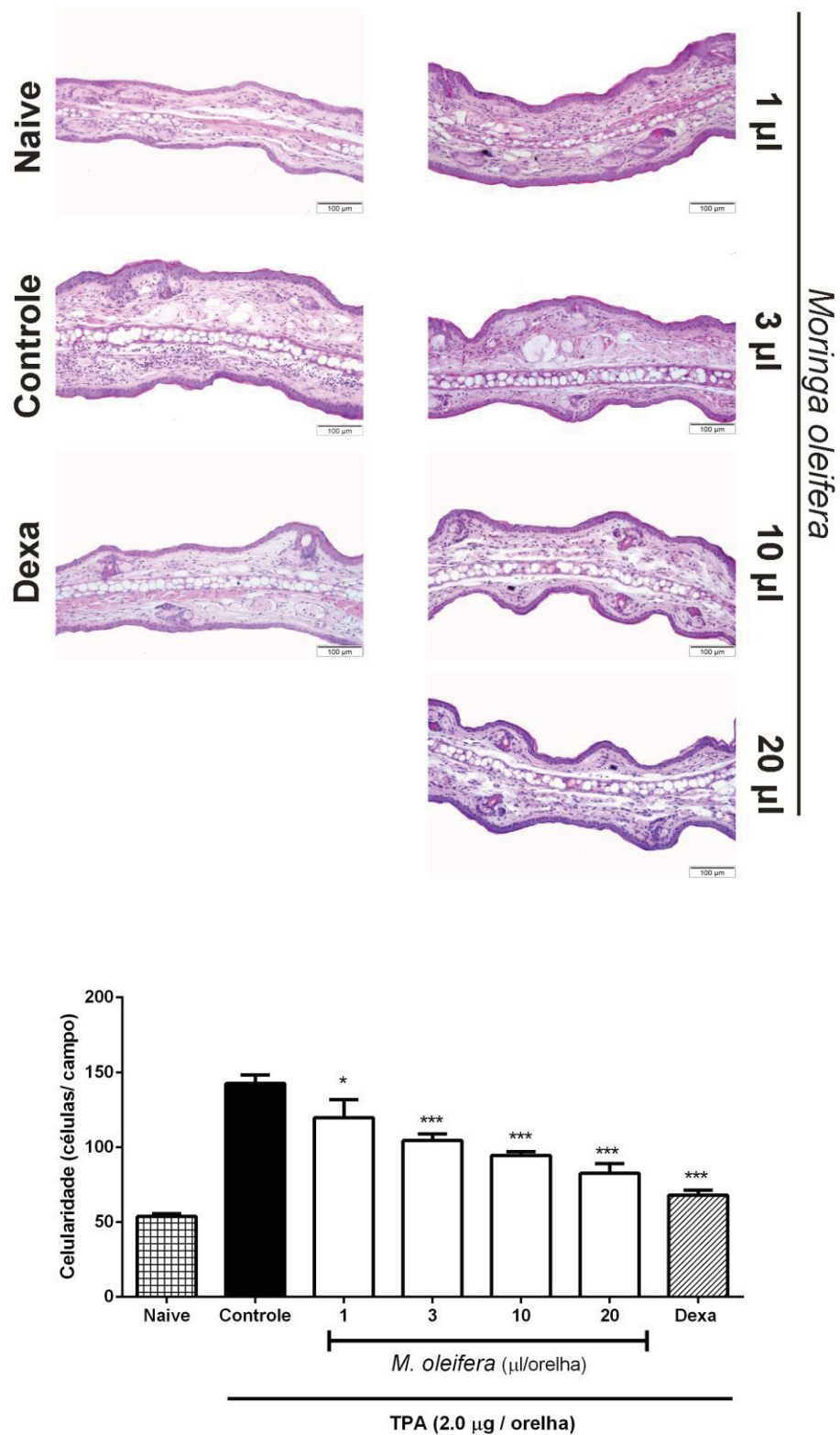


Figura 11. Efeito do tratamento tópico com o óleo da semente da *Moringa oleifera* (OSMO) em modelo de inflamação aguda. A partir de amostras teciduais (6mm) coletadas no do modelo de inflamação crônica induzida por TPA, foram realizadas análises histológicas, onde foi avaliada a celularidade. As barras representam a média \pm EPM (n=5). Os símbolos representam o nível de significância em relação ao controle ** P < 0,01 e *** P < 0,001.

5.3 EFEITO DO TRATAMENTO TÓPICO COM OSMO EM MODELO DE INFLAMAÇÃO CUTÂNEA CRÔNICA

A Figura 12 mostra que múltiplas aplicações de TPA promoveram um aumento significativo na espessura da orelha a partir do primeiro dia, sendo o processo inflamatório crônico estabilizado ao longo do período experimental. A administração tópica de OSMO foi capaz de reduzir a formação de edema induzido por TPA em $47,9 \pm 9,1\%$ e $47,1 \pm 16,1\%$, com 10 μ l / orelha e 20 μ l / orelha, respectivamente. O grupo de controle positivo, dexametasona, apresentou uma inibição de $77,52 \pm 7,02\%$, quando comparado ao grupo controle (Figura 12). No nono (último) dia de experimentação, as amostras de tecido foram coletadas e submetidas à análise enzimática.

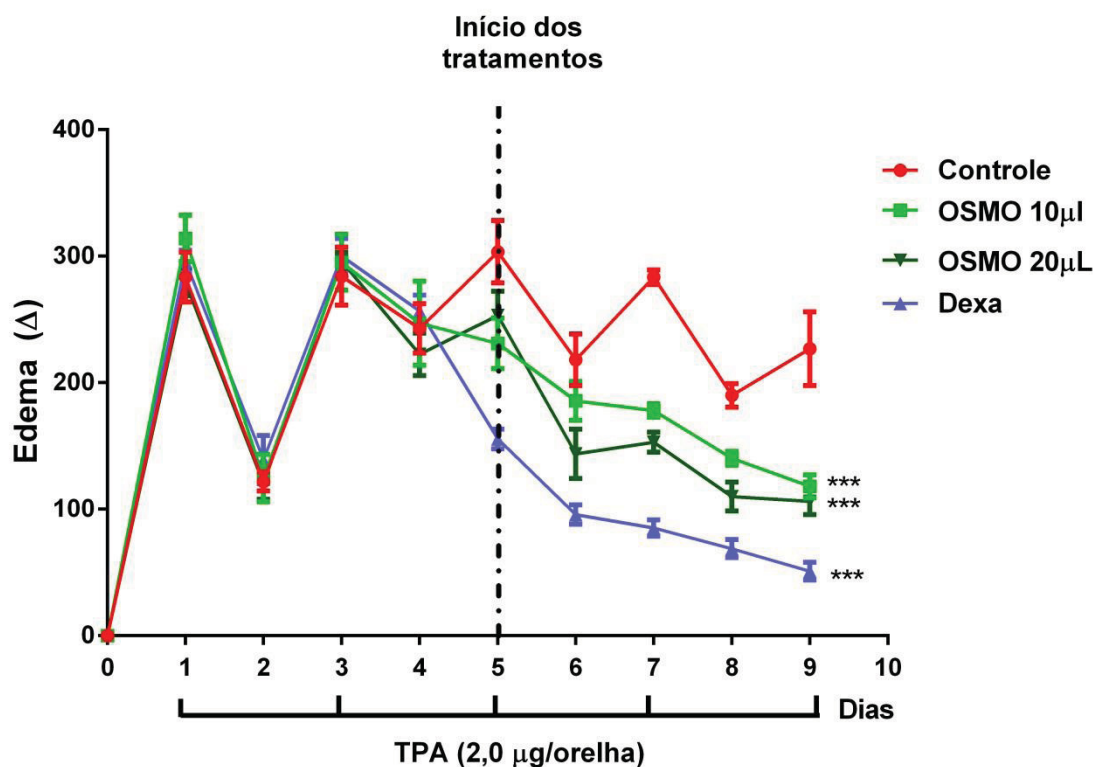


Figura 12. Efeito do óleo da semente da *Moringa oleifera* (OSMO) no edema induzido pela aplicação múltipla TPA. O processo inflamatório crônico foi induzido com a aplicação tópica de TPA (2,0 µg/orelha), em dias alternados durante 9 dias. O tratamento com OSMO puro (20 µl / orelha), diluído em acetona (10 µl / orelha) ou dexametasona (0,1 mg/orelha) e a foram realizados topicamente durante 4 dias, duas vezes ao dia (12/12 h) a partir do quinto dia de experimento, e a espessura da orelha medida diariamente. Os valores estão expressos como média ± EPM (n=5-6). Os símbolos representam o nível de significância em relação ao controle. ***P< 0,001.

Os resultados mostram que as aplicações repetidas de TPA promoveram aumento significativo na atividade das enzimas MPO e NAG (Figura 13 A e B). Os tratamentos com OSMO puderam reverter o aumento da atividade MPO, sendo estes iguais a $80,2 \pm 0,02\%$ (10 µl / orelha) e $89,8 \pm 0,02\%$ (20 µl / orelha). O tratamento com dexametasona reduziu a atividade de MPO em níveis basais ($112,7 \pm 0,05\%$) (Figura 13A). Da mesma forma, as aplicações tópicas de OSMO foram capazes de reduzir a atividade de NAG em $77,9 \pm 0,02$ (10 µl / orelha) e $78,9 \pm 0,02\%$ (20 µl / orelha), quando comparado ao grupo controle. A inibição pela dexametasona foi de $100,2 \pm 0,01\%$ (Figura 13B).

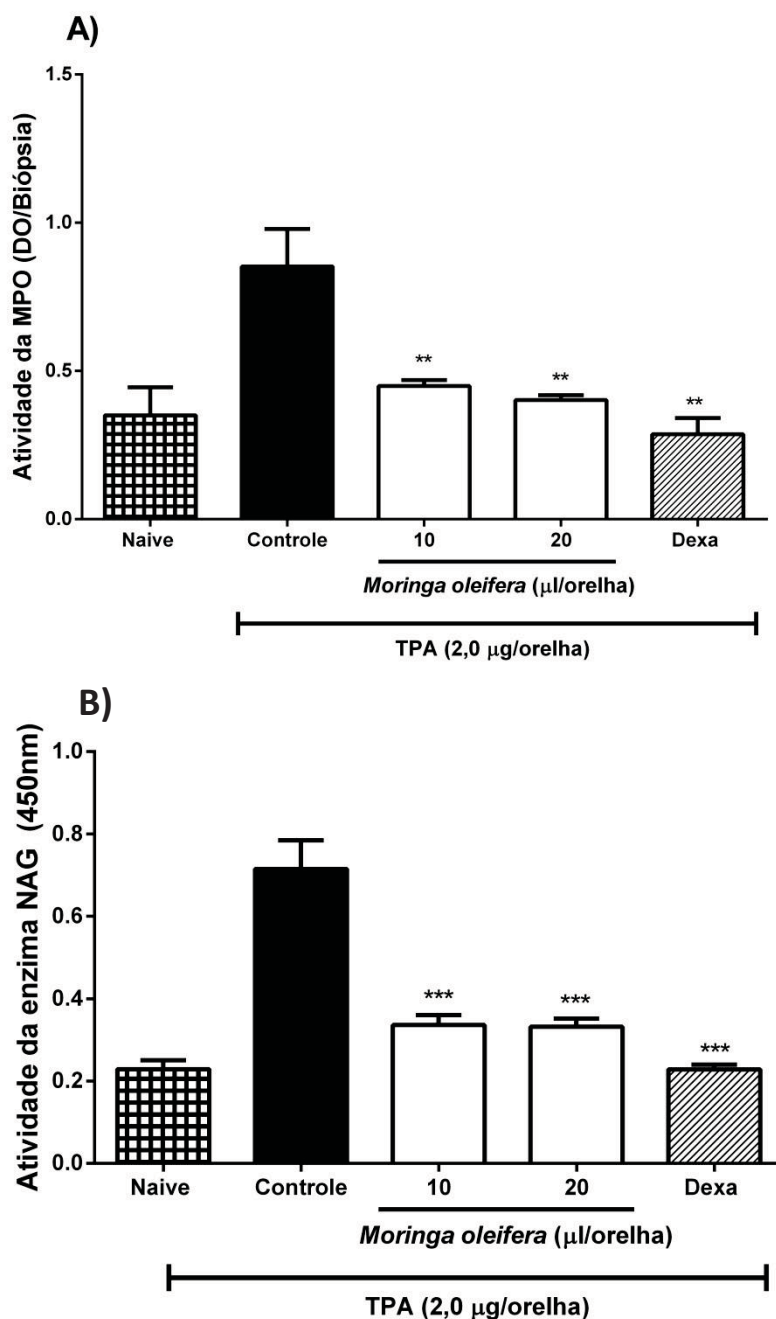


Figura 13. Efeito do tratamento tópico com o óleo da semente da *Moringa oleifera* (OSMO) na atividade das enzimas MPO e NAG, induzida pela aplicação múltipla de TPA. O processo inflamatório crônico foi induzido com a aplicação tópica de TPA (2,0 µg/orelha), em dias alternados durante 9 dias. O tratamento com OSMO puro (20 µl / orelha), diluído em acetona (10 µl / orelha) ou dexametasona (0,1 mg/orelha) foram realizados durante 4 dias (2 vezes ao dia) após o quinto dia do início do protocolo experimental. No último dia de tratamento amostras das orelhas (6mm) foram coletadas e submetidas à análise da atividade das enzimas MPO e NAG. As barras verticais representam a média ± EPM (n=5). Os símbolos representam o nível de significância em relação ao controle *** P< 0,001.

A análise histológica mostra que o tratamento com OSMO inibe a migração de células inflamatórias em $31,03 \pm 8,4\%$ (10 µl / orelha) e $52,43 \pm$

2,02% (20 μ l / orelha), quando comparado ao grupo controle (Figura 14A). Embora a aplicação de dexametasona tenha sido capaz de reduzir esse parâmetro inflamatório em $70,82 \pm 6,80\%$. As análises mostraram também que o tratamento com OSMO foi capaz de reduzir a espessura da epiderme em $17,53 \pm 2,9\%$ (20 μ l / orelha), de maneira semelhante, o tratamento com dexametasona reduziu este parâmetro em $37,22 \pm 1,3\%$ (Figura 14B). Os resultados não mostraram reduções significativas na espessura da epiderme nos grupos tratados com 10 μ l / orelha de OSMO (Figura 14).

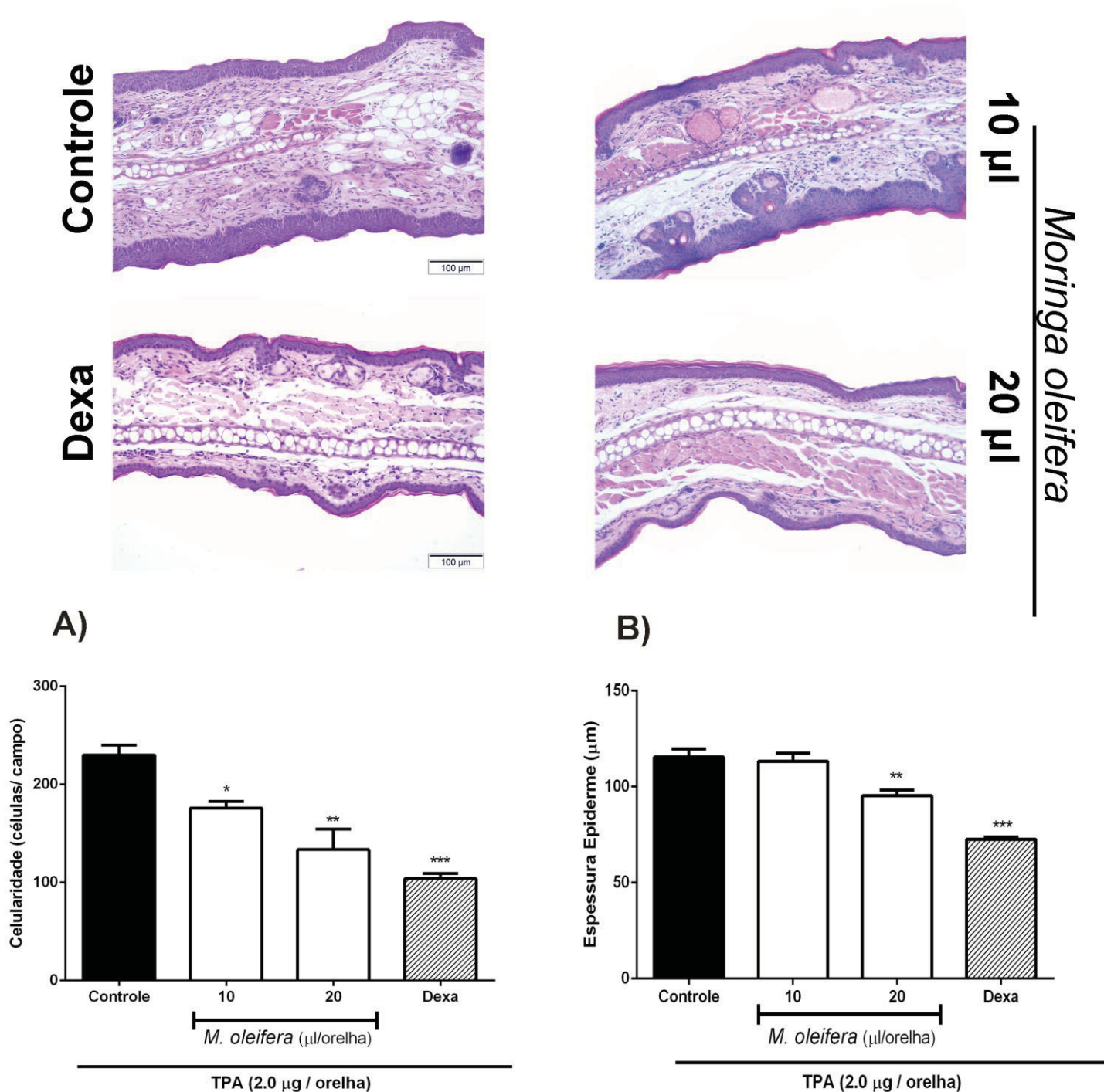


Figura 14. Efeito do tratamento tópico com o óleo da semente da *Moringa oleifera* (OSMO) em modelo de inflamação crônica. A partir de amostras teciduais (6mm) coletadas no último dia de protocolo experimental (dia 9), do modelo de inflamação crônica induzida por TPA, foram realizadas análises histológicas, onde foi avaliada a (A) celularidade e a (B) mensuração da espessura da epiderme. As barras representam a média ± EPM (n=5). Os símbolos representam o nível de significância em relação ao controle ** P< 0,01 e *** P< 0,001.

5.4 . AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA LOCAL DO OSMO

Para avaliar a atividade anti-inflamatória local do tratamento OSMO, o experimento foi realizado com a aplicação dos tratamentos na orelha contralateral ao agente clínico. Assim, os resultados mostram que a aplicação tópica de OSMO não foi capaz de reduzir a formação de edema induzido por TPA na orelha contralateral (Figura 15).

Conforme mostrado na Figura 15, a aplicação tópica de TPA foi capaz de promover o aumento da espessura da orelha e o tratamento contralateral com OSMO (10 e 20 μ l / orelha) não promoveu mudanças significativas na formação de edema. No entanto, o tratamento contralateral com dexametasona reduziu o edema em $77,3 \pm 13\%$, quando comparado ao grupo controle (Figura 15).

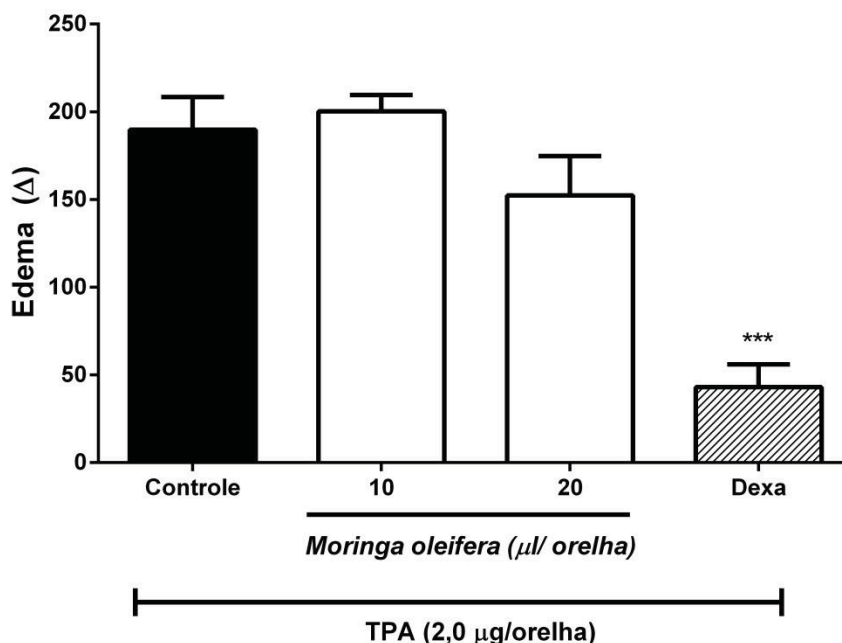


Figura 15. Avaliação do possível efeito sistêmico da administração tópica do óleo da semente da *Moringa oleifera* (OSMO). O processo inflamatório foi induzido na orelha direita dos animais pela administração tópica de TPA (2,0 $\mu\text{g}/\text{orelha}$). Em seguida, foi realizado o tratamento tópico, na orelha esquerda dos animais (contralateral), com o OSMO puro (20 μl / orelha), diluído em acetona (10 μl / orelha) ou dexametasona (0,1 mg/orelha). Após 6 horas da aplicação do agente flogístico, a espessura das orelhas foi medida com o auxílio de um micrômetro. As barras representam a média \pm EPM ($n=5$) do aumento da espessura da orelha. Os símbolos representam o índice de significância quando comparados os grupos tratamento com o grupo controle. *** $P<0,001$.

5.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO OSMO APÓS PRÉ-ADMINISTRAÇÃO DE ANTAGONISTA FARMACOLÓGICO DE RECEPTORES CORTICOSTEROIDES – MIFEPRISTONA (RU486)

O pré-tratamento com mifepristona (50 mg / kg, sc) não promoveu alterações na formação do edema de orelha induzido por TPA (Figura 16A). De maneira semelhante, o tratamento tópico com OSMO (20 μl / orelha) inibiu a formação do edema em $61,93 \pm 3,75\%$, e a dexametasona inibiu em $82,96 \pm 7,41\%$, em comparação com o grupo TPA / PEG400 ($237,7 \pm 13,46 \mu\text{m}$) (Figura 16).

Além disso, a pré-administração de mifepristona reverteu a resposta inibitória de OSMO ao edema induzido por TPA, quando comparado ao grupo de OSMO / PEG400 (Figura 16A). Resultados semelhantes foram observados no grupo tratado com dexametasona, onde o tratamento com o antagonista corticoide reverteu a atividade inibitória no edema da orelha, quando comparado ao grupo de dexametasona / PEG400 (Figura 16A).

Os resultados mostraram que essa reversão da atividade também foi observada na análise da atividade da enzima MPO, onde o tratamento OSMO reduziu a atividade do MPO induzido por TPA em $42,44 \pm 0,01\%$ e a dexametasona inibiu em $62,66 \pm 0,01\%$ (Figura 8B). No entanto, o pré-tratamento com o antagonista de corticóide foi capaz de reverter a atividade anti-inflamatória de OSMO e dexametasona (Figura 16B).

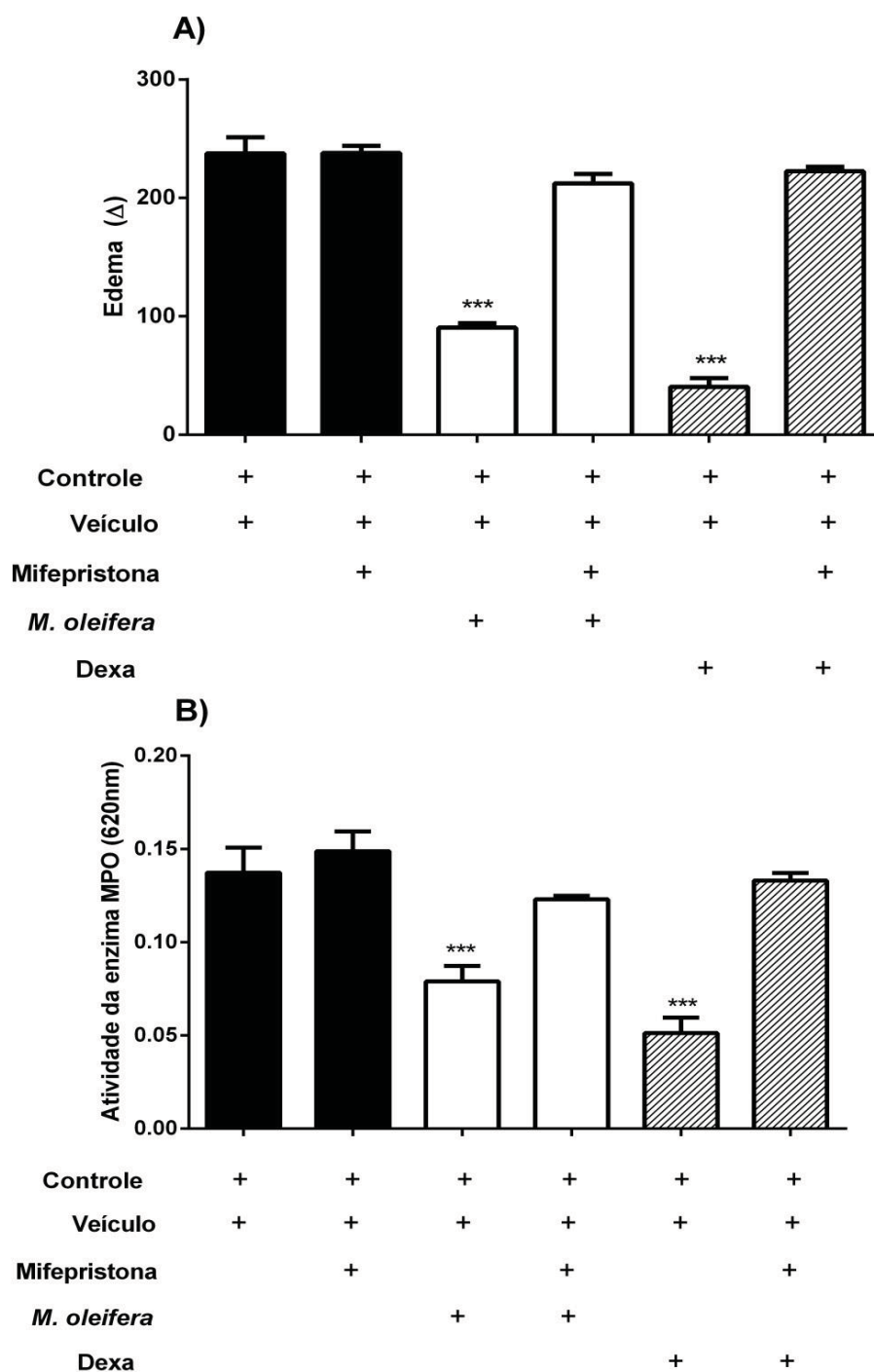


Figura 16. Avaliação da reversão da atividade anti-inflamatória do óleo da semente da *Moringa oleífera* (OSMO) pela mifepristona (RU 486). O tratamento com OSMO (20 μ l/orelha) ou dexametasona (0,01 mg/orelha) foram realizados por via tópica imediatamente após a administração de TPA. A mifepristona (50 mg/Kg, s.c.) foi administrada 30 minutos antes dos tratamentos. Veículo: polietilenoglicol 400, utilizado para a diluição da mifepristona. As barras verticais representam a média \pm EPM (n=5). (A) O edema foi mensurado 6 horas após a aplicação do TPA. (B) Atividade da enzima MPO. Os símbolos representam o nível de significância quando comparados ao grupo TPA+PEG400. *** P<0,001.

5.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO COM OSMO NA ATROFIA CUTÂNEA E NOS ÓRGÃOS LINFOIDES.

A Figura 17A demonstra que as múltiplas aplicações tópicas de dexametasona induziram atrofia da pele ($-24,83 \pm 5,6\%$), um efeito colateral local importante. Diferentemente, a aplicação repetida de OSMO não causou qualquer alteração tecidual (Figura 17).

A dexametasona também teve um efeito colateral de imunossupressão demonstrada pela redução do peso do baço ($22,10 \pm 0,4\%$), glândulas adrenais ($16,11 \pm 0,8\%$), linfonodo auricular ($77,35 \pm 0,9\%$) e timo ($53,37 \pm 0,39\%$), quando comparado ao grupo controle (naive). A maioria destes efeitos adversos não foram observados após múltiplas administrações com OSMO. Sendo que as aplicações OSMO apenas provocaram redução do peso do timo ($44,14 \pm 0,26\%$) (Figura 17).

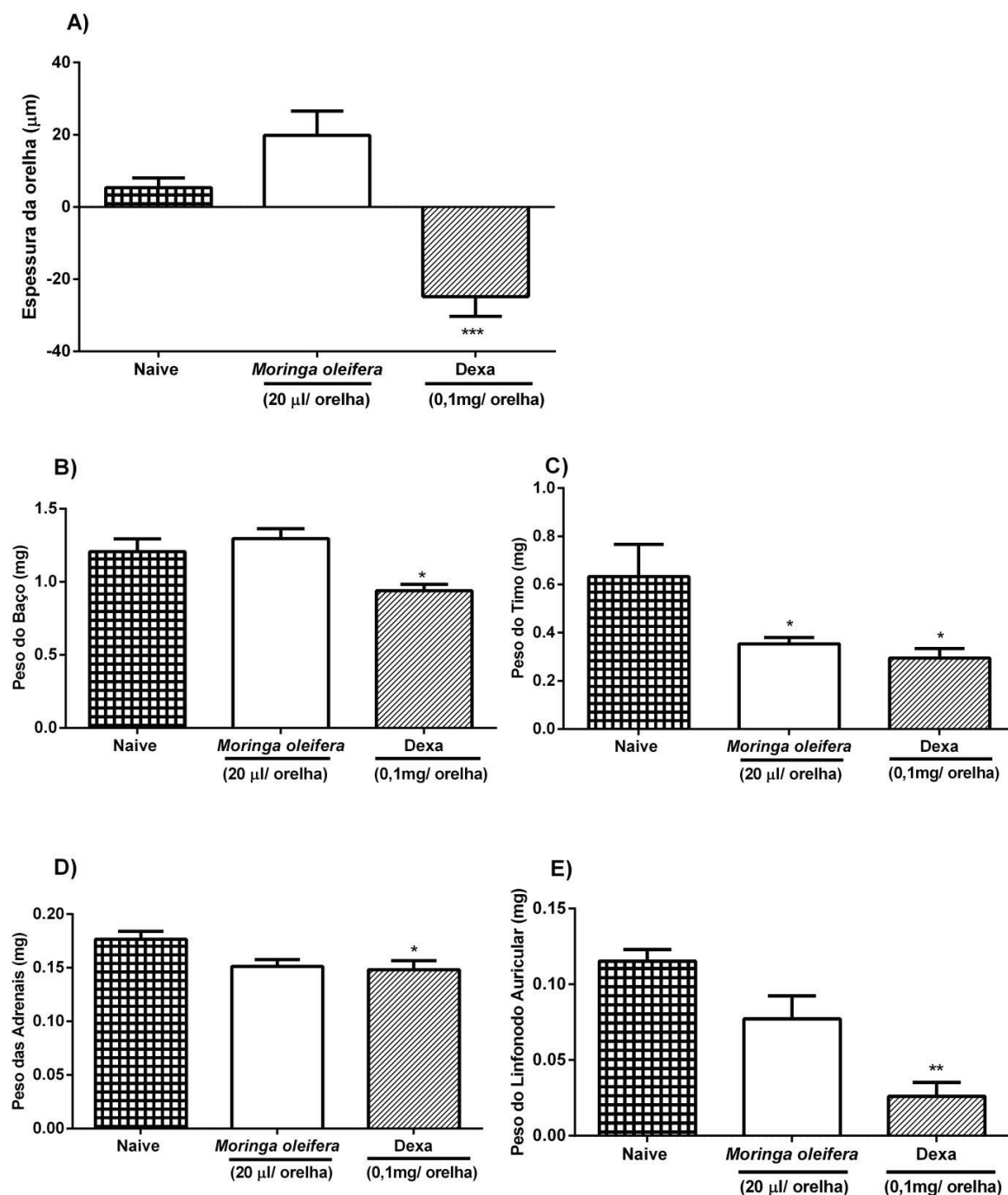


Figura 17. Avaliação do possível efeito tóxico da múltipla aplicação tópica do óleo da semente da *Moringa oleifera* (OSMO). Os animais foram tratados com OSMO (20 μl /orelha) ou dexametasona (0,1 mg/orelha), duas vezes ao dia (12/12 horas) durante 7 dias. Ao início (espessura basal) e ao final do tratamento a espessura das orelhas foi mensurada, e órgãos linfóides, assim como, as adrenais foram coletadas para avaliação. (A) Avaliação da atrofia cutânea, (B) peso do baço, (C) peso do Timo, (D) peso das adrenais e (E) peso do linfonodo auricular. As barras representam a média \pm EPM (n= 6-7). Os símbolos representam o índice de significância quando comparados os grupos tratamento com o grupo naive. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

6. DISCUSSÃO

As doenças da pele que têm sua gênese em processos inflamatórios e imunes, como a dermatite em geral e a psoríase, geram grandes sofrimentos físicos e psicológicos e exigem tratamento prolongado devido a altas taxas de recaída e ausência de tratamento curativo de longo prazo que sejam conhecidos (SOARES, 1995). Várias partes da *Moringa oleífera* foram descritas como tendo atividade anti-inflamatória e promovendo a melhoria das condições dermatológicas, sendo usadas desde tempos antigos na Índia, no sul do Himalaia e no Egito (FAIZAL et al., 2014). Devido às suas propriedades fitoterápicas, *M. oleífera* foi importada das regiões nativas e está bem adaptada em toda a região tropical, inclusive no Brasil (FRIGHETTO, 2007).

O óleo da semente da *Moringa oleífera* tem uma predominância de ácido oleico em sua composição de ácidos graxos, semelhante ao óleo de oliva (75 a 77 %). No presente estudo demonstramos que o óleo utilizado possuía uma concentração majoritária de ácido oleico 72,27 %, condizente com a literatura. O ácido oleico ($C_{18}H_{34}O_2$), ácido (Z)-octadec-9-enóico, é um ácido graxo monoinsaturado do tipo omega-9, sendo também identificado como 18:1 cis-9 (NADEEM e IMRAN, 2016). As propriedades conhecidas do ácido oleico envolvem atividade anti-inflamatória pela ativação de diferentes vias e seu papel na prevenção de doenças cardiovasculares e câncer de mama. Os mecanismos pelos quais o ácido oleico age no sistema imune inato envolvem a interferência na adesão e migração de neutrófilos, inibição da expressão endotelial de moléculas de adesão como VCAM-1, E-selectina e ICAM-1, e uma modulação na produção de espécies reativas de oxigênio por essas células (NADEEM e IMRAN, 2016; CARRILLO et al, 2012). O efeito do ácido oleico no sistema imune adaptativo envolve a inibição na proliferação de células T Jurkat e a redução na produção de IL-2 e INF-gama, sendo que dietas ricas em ácido oleico inibiram a proliferação celular no baço e linfonodos de células T e células NK (natural killers) em estudos em animais. Acredita-se que o alvo principal desse ácido graxo é a membrana celular onde será incorporado, afetando a função celular direta ou indiretamente por alguns mecanismos postulados como: aumentando a fluibilidade da membrana, o que

melhora a interação membrana-proteínas e modula a transdução do sinal; diminuindo a concentração de ácido araquidônico na membrana, melhora do perfil oxidativo, já que são menos sensíveis a peroxidação e produção de espécies reativas de oxigênio, modulação de vias intracelulares de sinalização e modulação da expressão de genes envolvidos na produção de citocinas (CARRILLO et al, 2012). O ácido oleico também é utilizado na fabricação de preparações farmacêuticas como pomadas, além de ter alto valor como agente de limpeza. Essas propriedades conferem ao óleo estabilidade para fazer parte de preparações como sabões, bálsamos, cremes, sabonetes e óleos de massagem. Em cosméticos o OSMO é preferível a outros óleos por não deixar gorduroso após a passagem (NADEEM e IMRAN,2016).

A atividade anti-inflamatória das sementes de *M. oleífera* em infusão já foi descrita a partir da avaliação no modelo de edema de pata induzida por carragenina, utilizando o tratamento via oral (CÁCERES et al, 1992). No entanto, o efeito anti-inflamatório tópico do óleo de sementes de *M. oleífera*, popularmente utilizado para fins cosméticos e dermatológicos, ainda não foi demonstrado (FAIZAL et al., 2014).

Para tanto inicialmente, demonstramos que a *Moringa* foi eficaz na inibição da dermatite causada pela aplicação tópica de diferentes irritantes (TPA, fenol e ácido araquidônico). Assim, os resultados observados com OSMO nos três modelos de dermatite indicam que o óleo provavelmente tem mais de um composto com diferentes mecanismos anti-inflamatórios.

A aplicação tópica de fenol mimetiza reações cutâneas em casos de dermatite irritativa de contato, que frequentemente ocorrem com a exposição a diferentes irritantes presentes em nossa vida diária, como, por exemplo, tintas, resinas, cosméticas e medicamentos e está muito relacionada a lesões de pele relacionadas a atividades laborais (MURRAY et al., 2007). Embora o mecanismo pelo qual o fenol promova o dano celular não seja totalmente elucidado, a irritação rápida da pele e a formação maciça de edema parece ser desencadeada por dano direto à membrana de queratinócitos epidérmicos, levando à liberação de mediadores pré-formados como IL1- α . No entanto, o principal mediador que mantém o processo inflamatório parece ser o estresse

oxidativo, estabelecido pela oxidação de fenol ou compostos fenólicos através da ação de várias enzimas teciduais (MURRAY et al., 2007; Wilmer et al., 1994). As enzimas peroxidases, tirosinases e prostaglandina H sintases atuam sobre o fenol, promovendo sua oxidação em radical fenoxil, que apesar de menos reativo que outros radicais, ainda é instável e leva a toxicidade cutânea ao interagir com componentes teciduais. Esse efeito ainda é agravado, pois os compostos tióis, com ação antioxidante, presentes na pele são capazes de reduzir os radicais fenoxil recuperando os compostos fenólicos que novamente sofrem a ação de enzimas teciduais, gerando um ciclo redox que sustenta a formação continuada de radicais livres. (MURRAY et al., 2007; WILMER et al., 1994). É interessante notar que nem todos os agentes com potencial anti-inflamatório tem a capacidade de inibir a formação de edema induzido por fenol, porque os mecanismos inflamatórios são distintos (LIM et al., 2004).

Ao mesmo tempo, o ácido araquidônico quando metabolizado, provoca o aumento de vários mediadores, tais como prostaglandinas, leucotrienos e hidroperóxidos lipídicos, que promovem a formação de edema e processo inflamatório (HUMES et al., 1986). Os fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são eficazes para prevenir edema induzido por AA, porque estes fármacos exercem os seus efeitos principalmente inibindo a atividade da enzima COX, promovendo a redução da síntese de prostaglandinas, incluindo PGE2 (NAKAMURA et al., 2003; ORIDO et al., 2008). Sabe-se também que os compostos com um perfil de ação semelhante a glicocorticoides não conseguem reverter a formação do edema induzido por AA (GABOR, 2000).

A resposta inflamatória produzida pela aplicação de TPA possui mecanismos que diferem dos mecanismos envolvidos na resposta desencadeada pela aplicação de AA. Outra diferença é evidenciada pela descoberta de que os inibidores de PLA2 não interferem na resposta inflamatória de AA, enquanto que eles têm um efeito anti-inflamatório pronunciado no modelo induzido por TPA (GABOR, 2000; OTUKI et al., 2005). Sendo assim, os resultados obtidos com o OSMO no modelo de AA indicam que um dos seus mecanismos como anti-inflamatório tópico deve envolver a inibição na via do AA.

O TPA é o principal éster de forbol encontrado no óleo de cróton e promove, quando aplicado à pele, um efeito irritante rápido e potente. Essas reações são desencadeadas pela ativação da proteína quinase C, que então promovem a ativação de PLA₂, levando a níveis aumentados de AA e metabólitos, como prostaglandinas e leucotrienos. Além disso, há a ativação de MAPKs, que fosforilam fatores de transcrição nuclear, como NF- κ B e AP-1, promovendo a liberação de várias proteínas pró-inflamatórias, como citocinas (IL-1 e TNF- α , IL-8 e MIP-1 β), moléculas de adesão (ICAM, VCAM e E-selectina), enzimas (iNOS e COX-2), entre outras que levam à formação de parâmetros inflamatórios clássicos, como vasodilatação e edema (GABOR, 2003; STANLEY et al., 1991; CALIXTO et al., 2004; KOLCH, 2005; PICKART, 2004).

Adicionalmente, a avaliação da atividade da enzima MPO em amostras de tecido retiradas 24 h após a administração de TPA mostra que o tratamento com OSMO foi eficaz em promover reduções da atividade da enzima MPO, o que é uma indicação indireta de que o OSMO está reduzindo o influxo de polimorfonucleares ao tecido inflamado. Esses achados foram confirmados através de análise histológica que demonstrou redução de celularidade nos grupos tratados com OSMO, quando comparado ao grupo controle. No entanto, como o principal ácido graxo presente no óleo é o ácido oleico que possui efeito anti-oxidante é possível que o mesmo tenha efeito em reduzir a atividade da MPO.

Sabe-se que, durante um processo inflamatório na pele, o aparecimento de um infiltrado leucocitário intenso ocorre como a primeira linha de defesa do corpo contra a agressão externa. Neutrófilos, polimorfonucleares têm uma ação primordial na resposta inflamatória aguda e são capazes de degradar proteínas reconhecidas como patógenos estranhos ou possíveis. Este sistema é caracterizado por uma alta concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS), prejudicial aos agentes patogênicos e que também pode prejudicar os hospedeiros (NEMETH e MOCSAI, 2012). Portanto, substâncias que são capazes de prevenir a infiltração ou atividade de neutrófilos no foco inflamatório, como observamos com a OSMO, são consideradas ferramentas

potenciais para a regulação de processos exacerbados (NEMETH e MOCSAI, 2012).

No tratamento subsequente de inflamação cutânea crônica causada por aplicações repetidas de TPA, o tratamento com OSMO reduziu significativamente a formação de edema, além de ter em sua forma pura revertido a hiperplasia da epiderme. Sabe-se que a aplicação repetida de TPA é considerada um método válido para a avaliação de compostos com potencial anti-inflamatório, uma vez que, este modelo tem capacidade para promover a hiperplasia epidérmica (semelhante à psoríase) com aumento de fator transformante de membrana do tipo beta 1 (TGF- β 1) e leucotrieno B₄. Este, por sua vez, causa um aumento na permeabilidade vascular facilitando o influxo de neutrófilos (MURAKAWA et al., 2006). Este método também tem a vantagem de que o tratamento começa após o processo inflamatório já estabelecido, como geralmente ocorre na prática clínica (MURAKAWA et al., 2006).

A análise da atividade de MPO e NAG após administrações repetidas com TPA mostrou que o tratamento com OSMO foi efetivo na inibição do aumento da atividade das enzimas MPO e NAG, assim como, a análise histológica demonstrou redução da presença células inflamatórias. Sendo assim, pode-se inferir que o tratamento com OSMO é capaz de prevenir a migração de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares, mesmo em processo inflamatório já estabelecido.

É importante ressaltar que enquanto a atividade da MPO está relacionada à presença de polimorfonucleares, a atividade da enzima NAG é utilizada como indicação da presença de leucócitos mononucleares no tecido inflamado, que geralmente estão presentes em grandes quantidades nos estágios tardios do processo inflamatório, semelhantes às doenças inflamatórias crônicas (CALIXTO et al., 2004; & MORENO, 1999; STANLEY et al., 1991). Este resultado demonstra que o óleo de sementes da planta *Moringa oleífera* apresenta a capacidade de interferir na migração de ambos os tipos celulares, polimorfonucleares e mononucleares.

Outro resultado interessante foi de que diferentemente do tratamento com dexametasona, a aplicação tópica OSMO não foi capaz de inibir a formação do edema induzido por TPA com tratamento na orelha contralateral. Este resultado sugere que, com as doses testadas, não há ação sistêmica dos compostos presentes no OSMO. Este efeito sistêmico é observado, normalmente, com a aplicação de glicocorticoides, o que explica alguns dos efeitos colaterais deste tipo de drogas (TIAN e LIU, 2012).

Apesar da indiscutível eficácia anti-inflamatória dos glicocorticoides, suas desvantagens clássicas são ressaltadas pelos efeitos adversos em muito relacionados ao fato de que os receptores glicocorticoides têm uma participação importantíssima na homeostasia do organismo, auxiliando na modulação de sistemas fisiológicos como o cardiovascular, metabólico e ósseo. Desta maneira, a administração de corticosteroides exógenos acaba por alterar esse sistema promovendo alterações que podem gerar diabetes, osteoporose, obesidade, hipertensão, etc. Sendo assim, há uma grande preocupação em manipular os efeitos pleiotrópicos dos medicamentos com atividade glicocorticoide para que tenham seus efeitos colaterais reduzidos, mantendo sua eficácia. (MCMASTER;RAY,2007).

De maneira semelhante, foi observado que administrações múltiplas de OSMO não promoveram atrofia cutânea, como observado no grupo tratado com dexametasona. A atrofia cutânea é o principal efeito adverso da terapia corticoide por via tópica. A aplicação repetida de glicocorticoides a pele pode gerar desestruturação da barreira cutânea, sem do que a lesão típica caracteriza-se por estrias largas onde a pele é muito fina, frágil transparente, com uma aparência eritematosa e brilhante, além da perda de água e formação de telangectasias. Estes efeitos ocorrem em decorrência da alteração na derme e epiderme com diminuição da espessura das camadas, redução dos queratinócitos, número dos fibroblastos e reorganização da estrutura das camadas. Esta atrofia pode ser prevenida com cuidados como a escolha de glicocorticoides de potência mais baixa e evitar tratamentos prolongados, porém uma vez estabelecida a atrofia é irreversível (SCHOEPE et al., 2006).

No entanto, embora o tratamento múltiplo com OSMO não tenha interferido no peso do baço, adrenal e linfonodo auricular (todos afetados pela administração de dexametasona), a administração repetida de OSMO causou redução do peso do timo, semelhante à dexametasona.

Mesmo quando administrados por via tópica os glicocorticoides são absorvidos em concentrações significativas, as quais podem gerar efeitos sistêmicos e alterações em órgãos relacionados aos efeitos fisiológicos dos corticoides, como é o caso dos órgãos linfoides (NIEMAN, 2011). A diminuição do peso das adrenais é um indicativo de que esteja ocorrendo supressão das mesmas pela retroalimentação negativa do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal causada pelo aumento da concentração circulante de glicocorticoides. Este é um efeito preocupante, pois muitos efeitos adversos graves ocorrem pela supressão adrenal, como inibição do crescimento, osteoporose, alterações neuropsiquiátricas e a síndrome de Cushing (SARNES et al., 2011).

O timo e baço, como órgãos linfoides, quando atrofiados podem indicar um efeito imunossupressor exacerbado pelo tratamento. A imunossupressão responsável pelo efeito terapêutico do tratamento, porém quando exacerbada pode gerar favorecimento ao aparecimento de infecções oportunistas por fungos, bactérias ou vírus (CUTOLO et al., 2008). Portanto, o fato de o OSMO ter tido a capacidade de promover atrofia do timo em sua apresentação pura sugere uma atividade imunossupressora e pode sugerir algum mecanismo de ação relacionado aos receptores de glicocorticoides.

Assim, o próximo passo foi avaliar a influência do antagonista de receptores corticoides (mifepristona) na atividade anti-inflamatória do OSMO. A mifepristona compete com o glicocorticoide pelo sítio de ação com afinidade até dez vezes maior que a do cortisol e três vezes maior que a da dexametasona (CASTINETTI et al, 2012). Ela é utilizada como ferramenta de pesquisa no desenvolvimento de novos medicamentos por poder de maneira muito eficaz identificar tratamentos que atuam através de receptores glicocorticoides.

A análise possibilitou observar que o pré-tratamento com mifepristona foi capaz de reverter a inibição do edema no grupo tratado com OSMO, sugerindo que o efeito anti-inflamatório do óleo da semente da *Moringa oleífera*, pelo menos em parte, envolve a participação de receptores de corticosteroides.

É importante considerar que se tratando do óleo bruto, onde diversos componentes estão presentes, esse efeito tipo corticoide pode ser resultado da atividade de um ou alguns componentes do extrato e não necessariamente de todos, sendo que outros componentes podem ter outros mecanismos responsáveis pelo seu efeito. Isso pode ser demonstrado pelo fato de o OSMO ser capaz de atuar na via de metabolização do ácido araquidônico como já discutido anteriormente.

Portanto, os resultados obtidos neste estudo mostram o uso potencial do OSMO para o tratamento de distúrbios inflamatórios de pele agudos e crônicos, especialmente com base nas características do OSMO, por apresentar possivelmente múltiplos mecanismos de ação. Isso poderia ser uma indicação de mais de um composto ativo no óleo. Na realidade, a demanda por medicamentos multicomponentes representa uma nova abordagem para o tratamento de doenças crônicas que muitas vezes são multifatoriais e que atualmente conta com terapias disponíveis muitas vezes ineficazes, isso implica na necessidade de novas abordagens com compostos que atuem em vários alvos moleculares e que, portanto, possuem mecanismos diferentes (TIAN e LIU, 2012).

Mesmo que o OSMO tenha algum efeito nos receptores de corticosteroides, ele demonstrou ação em modelos que não envolvem esses mecanismos, como os relacionados à via do ácido araquidônico e possui ações sistêmicas e efeitos colaterais mais brandos em comparado à dexametasona.

Sendo assim, este estudo apresenta pela primeira vez a eficácia do uso do óleo da semente da planta *Moringa oleífera*, como descrito amplamente por seu uso popular. Os resultados sugerem certa segurança para o uso do OSMO como um potencial fitoterápico tópico. Ainda é importante destacar, que

mesmo que o óleo da semente da *M. oleifera* tenha apresentado um valioso efeito anti-inflamatório tópico em diversos modelos inflamatórios de pele e mostrando ser de grande relevância na busca de novas ferramentas terapêuticas para doenças inflamatórias da pele, ainda são necessárias avaliações adicionais para esclarecer todo o mecanismo de ação da OSMO, bem como os compostos ativos presentes no óleo.

7. CONCLUSÃO

- O óleo da semente da *M. oleifera* apresenta atividade anti-edematogênica quando aplicado por via tópica em diversos modelos de inflamação cutânea agudos;
- O tratamento tópico com o óleo da semente da *M. oleifera* é capaz de reduzir o influxo de células inflamatórias para o tecido inflamado;
- O óleo da semente da *M. oleifera* é capaz de reduzir um processo inflamatório já estabelecido;
- Os efeitos anti-inflamatórios observados com o tratamento com o óleo da semente da *M. oleifera* parece ser mediado, ao menos em parte, pela ativação de receptores corticoides;
- O tratamento tópico com o óleo da semente da *M. oleifera* não promove alguns efeitos adversos observados em tratamentos repetidos com glicocorticoides, podendo ser uma importante alternativa terapêutica mesmo quando utilizado puro;

REFERÊNCIAS

ASHIKIN, NURUL et al. *Moringa oleifera* Lam: Targetin Chemoprevention. Asian Pac J Cancer Prev v.1, n.7, p.3675–86. 2016.

BHAGWAT, S. S.; MANNING, A. M.; HOEKSTRA, M. F.; LEWIS, A. Gene-regulating protein kinases as important anti-inflammatory targets. Drug Discov Today, v. 4, n. 10, p. 472-479, 1999.

BUCKLE, D. R.; HEDGECOCK, C. J. R. Drug targets in inflammation and immunomodulation. Drug Discovery Today, v. 2, n. 8, p. 325-332, 1997.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). Braz J Med Biol Res, v.33, n.2, Feb, p.179-89. 2000.

CALIXTO, J.B., CAMPOS, M.M., OTUKI, M.F., SANTOS, A.R. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. Planta Med v.70, p.93-103. 2004.

CANDI, E., SCHMIDT, R., MELINO, G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. Nat Rev Mol Cell Biol v.6, p.328-340, 2005.

CÁCERES, A et al.. Pharmacologic Properties of *Moringa Oleifera*: Screening for Antispasmodic, Anti-inflammatory and Diuretic Activity. Journal of Ethnopharmacology v. 36, n.3, p.233–37, 1992.

CARRILLO, C.,CAVIA, M.DEL M.;ALONSO-TORRE,S. Role of oleic acid in immune system; mechanism of action; a review. Nutrición Hospitalaria v.27, n.4, p.978-990, 2012.

CASTINETTI; BRUE; CONTE-DEVOLX,B. The use of glucocorticoid receptor antagonist mifepristone in Cushing's syndrome. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, v19,n.4, p.295-9. 2012.

CHOI, EUN-JU et al. Topical Application of *Moringa Oleifera* Leaf Extract Ameliorates Experimentally Induced Atopic Dermatitis by the Regulation of Th1/Th2/Th17 Balance.Biomedicine & Pharmacotherapy v.84, p.870–77, 2016.

CRUMMEY, A.; HARPER, G.P.; BOYLE, E.A.; MANGAN, F.R. Inhibition of arachidonic acid-induced ear oedema as a model for assessing topical anti-inflammatory compounds. Agents and Actions, v. 20, p. 69-76, 1987.

CUTOLO et al,.Use of glucocorticoids and risk of infections. Autoimmun Rev, v8, n2, p153-5, 2008.

DEBENEDICTIS, C., JOUBEH, S., ZHANG, G., BARRIA, M., GHOHESTANI, R.F.,Immune functions of the skin. Clin Dermatol 19, 573-585, 2001.

DE YOUNG, L.M., KHEIFETS, J.B., BALLARON, S.J. AND YOUNG, J.M. Oedema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions*, v.26, p. 335-341, 1989.

DISEPIO, D.; CHANDRARATNA, R.A.; NAGPAL, S. Novel approaches for the treatment of psoriasis. *Drug Discovery Today*, v. 4, p. 222-231, 1999.

EL GHAOU, W. B. et al. The effects of *Alcea rosea* L., *Malva sylvestris* L. and *Salvia libanotica* L. water extracts on the production of anti-egg albumin antibodies, interleukin-4, gamma interferon and interleukin-12 in BALB/c mice. *Phytother Res*, v.22, n.12, Dec, p.1599-604. 2008.

FAIZAL, AHMAD et al. Mini-review : Health benefits of *Moringa Oleifera*. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. V.15, n.20, p.8571–76, 2014.

FIRESTEIN, G.S. Mechanisms of inflammation and tissue repair. In: GOLDMAN, L. e ANSIELLO, D. *Textbook of Medicine*, 22 ed., p. 227, 2004.

FOX, L.P. *Farmacologia dermatológica*. In: BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. *Goodman & Gilman - As bases farmacológicas da terapêutica*. 11. ed. Rio de Janeiro: McGrawHill, p. 1534-1537, 2006.

FREINKEL, R.K., WOODLEY, D. *The biology of the skin*. Parthenon Pub. Group, New York, 2001.

FRIGHETTO, R. T. S.; FRIGHETTO, N.; SCHNEIDER, R. P.; FERNANDES LIMA, P. C. O Potencial Da Espécie Moringa Oleifera (Moringaceae) : A Planta Como Fonte de Coagulante Natural No Saneamento de Águas E Como Suplemento Alimentar, Fitos. p. 78-88, Jun, 2007.

FUCHS, E., RAGHAVAN, S. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. Nat Rev Genet v.3, p.199-209, 2002.

GABOR, M. Mouse Ear Inflammation Models and their Pharmacological Applications. Budapest: Akadémiai Kiadó, p.24-37, 2000.

GABOR, M. Models of acute inflammation in the ear. Methods Mol Biol v.225, p.129-137. 2003.

GOTTLIEB, A.B. Therapeutic options in the treatment of psoriasis and atopic dermatitis. Journal of the American Academy Dermatology. v. 53 , p. s3-16, 2005.

GOTHAI, SIVAPRAGASAM, PALANISAMY ARULSELVAN, WOAN SEAN TAN, AND SHARIDA FAKURAZI. Wound Healing Properties of Ethyl Acetate Fraction of Moringa Oleifera in Normal Human Dermal Fibroblasts. Journal of intercultural ethnopharmacology v.5, n.1, p. 1–6, 2016.

GUTTMAN-YASSKY, E.; LOWES, M.A.; FUENTES-DUCULAN, J.; WHYNOT, J.; NOVITSKAYA, I; CARDINALE, I.; HAIDER, A.; KHATCHERIAN, A.; CARUCCI, J.A.; BERGMAN, R.; KRUEGER, J.G. Major differences in inflammatory dendritic cells and their products distinguish atopic dermatitis from

psoriasis. *Journal of Allergy Clinical Immunology*, v. 119, n.5, p.1210-1217, 2007.

HAAKE, A., SCOTT, G.A., HOLBROOK, K.A. Structure and function of the skin: Overview of the epidermis and dermis. *The Biology of the Skin*, 2001.

HENNINO, A.; SAINT-MEZARD, P.; NICOLAS, J. F; VACANSON, M.; DUBOIS, B.; CHAVAGNAC, C.; KAISERLIAN, D. Fisiopatologia da dermatite de contato alérgica: papel das células T CD8 efectoras e das células T CD4 regulatórias. *An Bras Dermatol*. v.80, n.4, p.335-47, 2005.

HORINOUCI, C.D., MENDES, D.A., SOLEY B DA, S., PIETROVSKI, E.F., FACUNDO, V.A., SANTOS, A.R., CABRINI, D.A., OTUKI, M.F. *Combretum leprosum* Mart. (Combretaceae): potential as an antiproliferative and anti-inflammatory agent. *J Ethnopharmacol* v.145, p.311-319. 2013.

HUMES, J.L.; OPAS, E.E.; BONNEY, R.J. Arachidonic acid metabolites in mouse ear oedema. LEWIS, A. e CAPETOLA, R. In: *Advances in Inflammations Research I*. New York: Raven Press, p. 57-65, 1986.

KARIM, N.A.; IBRAHIM, M.D.; KNTAYYA, S.B.; RUKAYADI, Y.; HAMID, H.A.; RAZIS, AF. *Moringa Oleifera* Lam: Targeting Chemoprevention. *Asian Pac J Cancer Prev* v.17, n.3675–86, 2016.

KOLCH, W. Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol* v. 6, p.827-837. 2005.

KOSTER, M.I., ROOP, D.R. Genetic pathways required for epidermal morphogenesis. *Eur J Cell Biol* v.83, p.625-629, 2004.

KRUEGER, J.G., BOWCOCK, A. Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis. *Ann Rheum.* v. 64 n. 2, p30-36, 2005.

LEUNG, D.Y.M.; BOGUNIEWICZ, M., HOWEL, M.D.; NOMURA, I. HAMUD, Q. A. New insights into atopic dermatitis. *Journal of Clinical Investigation*, v. 113, p. 651-657, 2004.

LIM, H.; PARK, H.; KIM, H. P. Inhibition of contact dermatitis in animal models and suppression of pro-inflammatory gene expression by topically applied flavonoid, wogonin. *Arch Pharm Res*, v. 27, n 4, p 442-8, Apr 2004.

MANTLE, D. et al. Adverse and beneficial effects of plant extracts on skin and skin disorders. *Adverse Drug React Toxicol Rev*, v.20, n.2, Jun, p.89-103. 2001.

MCMASTER, A.; RAY, D.W. Modelling the glucocorticoid receptor and producing therapeutic agents with anti-inflammatory affects but reduced side-effects. *Exp Physiol*, v.92, n.2, p299-309. 2007

MICHL, CARINA et al. The Chemopreventive Phytochemical Moringin Isolated from *Moringa Oleifera* Seeds Inhibits JAK/STAT Signaling. *PLoS ONE*. V. 11, n.6, p. 1–20, 2016.

MURAKAWA, M., YAMAOKA, K., TANAKA, Y., FUKUDA, Y. Involvement of tumor necrosis factor (TNF)-alpha in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. *Biochem Pharmacol* v.71, p.1331-1336. 2006.

MURRAY, A.R.; KISIN, E.; CASTRANOVA, V.; KOMMINENI, C.; GUNTHER, M.R.; SHVEDOVA, A.A. Phenol-induced in vivo oxidative stress in skin: evidence for enhanced free radical generation, thiol oxidation, and antioxidant depletion. *Chen res Toxicol*, v.20, n 12, p. 1769-77. 2007.

NADEEM, M.; IMRAN,M. Promising features of Moringa oleifera oil: recent updates and perspectives. *Nadeem and Imran Lipids in Health and Disease* v.15. n.212. 2016.

NAKAMURA, Y.; KOZUKA, M.; NANIWA, K.; TAKABAYASHI, S.; TORIKAI, K.; HAYASHI, R.; SATO, T.; OHIGASHI, H.; OSAWA, T. Arachidonic acid cascade inhibitors modulate phorbol ester-induced oxidative stress in female ICR mouse skin: differential roles of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase-2 in leukocyte infiltration and activation. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 35, p. 997-1007. 2003.

NEMETH, T.; MOCSAI. A. The role of neutrophils in autoimmune diseases. *Immunology Letters*, v. 143, n.1, p9-19. 2012.

NICKOLOFF, B.J. e NESTLÉ, F.O. Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities. *Journal Clinical Investigation*, v.13, p. 1664-1675, 2004.

NIEMAN, L.K. Consequences of systemic absorption of topical glucocorticoids. *Am Acad Dermatol*, v65, n1, p250-2. 2011

NORRIS, A. et all. Targeting mast cells. *Expert Opin Investig Drugs*. v.13, p.739-741, 2004.

PUIGNERO, V.; QUERALT, J. Effect of topically applied cyclooxygenase-2-selective inhibitors on arachidonic acid- and tetradecanoylphorbol acetate-induced dermal inflammation in the mouse. *Inflammation*, v. 21, n. 4, p. 431-42, 1997.

OLSON, Mark E.; FAHEY, Jed W. *Moringa oleifera*: uma árvore multiuso para áreas tropicais secas. *Rev. Mex. Biodiv.*, México, v. 82, n. 4, p. 1071-1082, dic. 2011 .

ORIDO, T.; FUJINO, H.; HASEGAWA, Y.; TOYOMURA, K.; KAWASHIMA, T.; MURAYAMA, T. Indomethacin decreases arachidonic acid uptake in HCA-7 human colon cancer cells. *Journal of Pharmacological Sciences*, v. 108, p. 389-392. 2008.

PICKART, C.M. Back to the future with ubiquitin. *Cell* v.116, p.181-190. 2004.

RATES, S. M. Plants as source of drugs. *Toxicon*, v.39, n.5, May, p.603-13. 2001.

RANG, H. P.; DALE, M.M; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J. Farmacologia. Rio de Janeiro: Elsevier, 6 ed., 2007.

ROCHA, MARCOS FÁBIO GADELHA et al. "Extratos de Moringa Oleifera E Vernonia Sp. Sobre Candida Albicans E Microsporum Canis Isolados de Cães E Gatos E Análise Da Toxicidade Em Artemia Sp." Ciênc. rural v.41, n.10, p. 1807–1812, 2011.

RYAN, T. The ageing of the blood supplly and the lymphatic drainage of the skin. The International Research and Review Journal for Microscopy, v. 35, p. 161-171, 2004.

SAMPAIO, A. L.; RAE, G. A.; HENRIQUES, M. M. Role of endothelins on lymphocyte accumulation in allergic pleurisy. J Leukoc Biol, v. 67, n. 2, p. 189-95, 2000.

SANCHEZ, T.; MORENO, J. J. Role of leukocyte influx in tissue prostaglandin H synthase-2 overexpression induced by phorbol ester and arachidonic acid in skin. Biochem Pharmacol, v. 58, n. 5, p. 877-9, 1999.

SARNES, E. et al. Incidence and US cost of corticosteroid-associated adverse events: a systematic literature review. Clin Ther, v 33, n10, p 1413-32, 2011.

SCHOEPE, S.; SCHACKE, H. MAY, E.; ASADULLAH, K. Glucocorticoid therapyinduced skin atrophy. Experimental Dermatology. v. 15 ,p. 406-420, 2006.

SCHÄCKE, H; DÖCKE, W.; ASADULLAH, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacology & Therapeutics*. v. 96, p. 23-43, 2002.

SIMMONS, D.L. What makes a good anti-inflammatory drug target? *Drug Discovery Today*, v.11, p. 210-219, 2006.

STANLEY, P.L., STEINER, S., HAVENS, M., TRAMPOSCH, K.M. Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Skin pharmacology : the official journal of the Skin Pharmacology Society* v.4, p.262-271, 1991.

SPELLBERG, B. The cutaneous citadel: a holistic view of skin and immunity. *Life Sciences*, v. 67, p. 477-502, 2000

SORRELL, .M.; CAPLAN, A.I. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *Journal of Cell Science*, v. 117, p. 667-675, 2004.

STROHL, W. R. The role of natural products in a modern drug discovery program. *Drug Discov Today*, v.5, n.2, Feb, p.39-41. 2000.

TIAN, X.Y.; LIU, L. Drug Discovery enters a new era with multi-target intervention strategy. *Chin J Integr med*, v.18, n.7, p 539-42. 2012.

VERPOORTE, R.; MEMELINK, J. Engineering secondary metabolite production in plants. *Curr Opin Biotechnol*, v.13, n.2, Apr, p.181-7. 2002.

WILLIAMS, I.R., KUPPER, T.S. Immunity at the surface: homeostatic mechanisms of the skin immune system. *Life Sci.* v.58, p.1485-1507, 1996.

WILMER, J.L.; BURLESON, F.G.; KAYAMA, F.; KANNO, J.; LUSTER, M.I. Cytokine induction in human epidermal keratinocytes exposed to contact irritants and its relation to chemical-induced inflammation in mouse skin. *J Invest Dermatol*, v. 102, n. 6, p. 915-22. 1994.

WINYARD, P.G. e WILLOUGHBY, D.A. Key stages in the acute inflammatory response and their relevance as therapeutic targets. *Inflammation Protocols*, New Jersey: Humana Press, p.3-4, 2003.